

Validação de métodos na análise química de laticínios

Rita Mendes Costa

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento Química e Bioquímica

2017

Orientadores

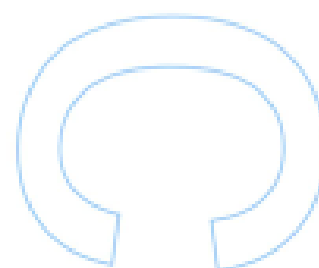
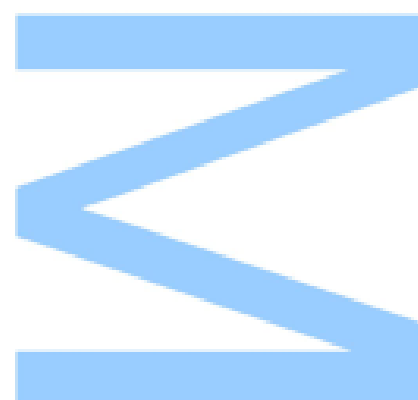
Nuno Filipe de Sousa Vale, Investigador externo, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Alice Santos, Responsável do Departamento de Química, *Silliker Portugal*

Co-orientadores

Victor Armando Pereira Freitas, Diretor do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Laura Sousa, Analista, *Silliker Portugal*





Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

É com enorme prazer que, no final destes 9 meses de aprendizagem e dedicação, expresso a minha gratidão a todos os que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a finalização desta grande etapa. Durante a realização deste estágio foi constante o apoio de inúmeras pessoas, que ajudaram a atingir as metas que aspirei, nomeadamente:

Ao Professor Nuno Vale, por ter aceite orientar a minha Tese de Mestrado, por toda a transmissão de conhecimentos, orientação e por toda a ajuda efetuada na revisão final deste relatório.

Ao Professor Victor Freitas, diretor do mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar, pela organização de mais uma edição do referido mestrado.

À Eng^a Laura Sousa, que me acompanhou e me ajudou tanto na realização do trabalho laboratorial como na execução desta Tese, tendo sido um contributo muito positivo para a melhoria desta.

A toda a equipa da *Silliker*, à qual devo um enorme agradecimento por me ter proporcionado esta experiência que tanto me enriqueceu a nível pessoal e profissional.

Aos meus pais e à minha irmã, pelo apoio incondicional que demonstraram desde o início, pelas palavras de encorajamento e pelo voto de confiança que depositaram em mim, mesmo quando eu duvidei.

Um agradecimento muito especial às minhas amigas, que estiveram ao meu lado todos estes anos e que vão continuar para sempre na minha vida.

À Mafalda, à Tânia e à Rita, que passaram de colegas a amigas, obrigada por todos os momentos que passamos juntas e que garanto que nunca esquecerei.

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito da unidade curricular Estágio do Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar da Universidade do Minho/Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. O estágio realizou-se no período de Outubro de 2016 a Junho de 2017 na empresa *Silliker* Portugal, SA.

Com a constante evolução do sector alimentar, é de extrema importância ter os dois pilares desta indústria bem definidos: a segurança e a qualidade alimentar. De forma a garantir estes dois conceitos, as análises a alimentos estão a tornar-se cada vez mais relevantes e frequentes, sendo efetuadas com base em métodos analíticos. O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido envolve o processo de validação, conferindo a garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico.

O presente trabalho teve como principal objetivo a validação de 4 normas ISO referentes à determinação de diversos parâmetros em diferentes matrizes lácteas, pretendendo demonstrar que os procedimentos analíticos referentes a estas normas são adequados à finalidade pretendida. Sendo a validação um processo muito importante, o trabalho incidiu na implementação e execução em condições reais dos métodos para a determinação do conteúdo total de sólidos em leites, natas e leite evaporado e em queijos e queijos processados (ISO 6731 e ISO 5534, respetivamente), para a determinação do conteúdo de matéria gorda em manteigas, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar (ISO 17189) e para a determinação do pH do soro da manteiga (ISO 7238).

Os métodos analíticos acima descritos foram realizados experimentalmente e foram validados internamente de acordo com os seguintes parâmetros de validação: precisão (repetibilidade e precisão intermédia), exatidão, limite de quantificação, gama de trabalho e incerteza.

Através do estudo destes parâmetros para as 4 normas ISO, concluiu-se que todos os métodos são adequados atendendo à exatidão e à precisão e que mostraram apresentar resultados fiáveis, podendo ser aplicados para o seu propósito.

Palavras-Chave: Validação, Laticínios, Repetibilidade, Precisão Intermédia, Exatidão, Limite de Quantificação, Gama de Trabalho e Incerteza.

Abstract

This report was developed within the course unit of the Master Degree in Technology and Food Science of the University of Minho/Faculty of Sciences of the University of Porto. The internship took place from October 2016 to June 2017 at the company *Silliker* Portugal, SA.

With the constant evolution of the food sector, it is extremely important to have the two pillars of this industry well defined: safety and food quality. In order to guarantee these two concepts, food analyzes are becoming increasingly relevant and frequent, being carried out based on analytical methods. The development of an analytical method, the adaptation or implementation of a known or new method involves the validation process, guaranteeing operational quality and analytical performance.

The main objective of this report was the validation of 4 ISO standards for the determination of several parameters in different dairy products, aiming to demonstrate that the analytical procedures related to these standards are adequate for the intended purpose. Since validation is a very important process, this report focused on the implementation and execution under real conditions of the methods for the determination of the total solids content in milk, cream and evaporated milk and processed cheese and cheese (ISO 6731 and ISO 5534, respectively) for the determination of the fat content in butters, edible oil emulsions and spreadable fats (ISO 17189) and for the determination of pH of the serum of the butter (ISO 7238).

The analytical methods described above were performed experimentally and were internally validated according to the following validation parameters: precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, quantification limit, range of work and uncertainty.

Through the study of these parameters for the 4 ISO standards, it was concluded that all methods are adequate given the accuracy and precision and that they have shown reliable results and can be applied for their purpose.

Key-Words: Validation, Dairy Products, Repeatability, Intermediate Precision, Accuracy, Limit of Quantification, Range of Work and Uncertainty.

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo	IV
Abstract	V
Índice de tabelas.....	XI
Índice de Figuras	XVI
Abreviaturas	XVII
1. Enquadramento do trabalho.....	1
2. Objetivos e esquema do trabalho.....	1
3. A empresa.....	3
4. Fundamentos Teóricos	6
4.1. A importância dos produtos lácteos na saúde.....	6
4.1.1. Produtos lácteos e a saúde óssea	7
4.1.2. Produtos lácteos e a obesidade.....	7
4.1.3. Produtos lácteos e a doença cardiovascular.....	8
4.2. Composição dos diferentes produtos lácteos.....	8
4.2.1. Leite	8
4.2.2. Manteiga e Margarina.....	10
4.2.3. Queijo.....	11
4.2.4. Iogurte	12
4.2.5. Natas.....	14
4.2.6. Leite evaporado.....	15
5. Validação de métodos na análise química	16
5.1.1. Avaliação indireta	18
5.1.2. Avaliação direta	31
5.1.3. Análise estatística.....	36
6. Metodologia utilizada	38

6.1. ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar-	
Determinação da matéria gorda.....	38
6.1.1. Objetivo e princípio do método	38
6.1.2. Campo de aplicação.....	38
6.1.3. Materiais e Equipamentos	38
6.1.4. Reagentes	39
6.1.5. Preparação da amostra	39
6.1.6. Procedimento	40
6.2. ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado- Determinação do conteúdo total de	
sólidos	41
6.2.1. Objetivo e princípio do método	41
6.2.2. Campo de aplicação.....	41
6.2.3. Materiais e Equipamentos	41
6.2.4. Preparação das amostras.....	41
6.2.5. Procedimento	42
6.3. ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)...	43
6.3.1. Objetivo e princípio do método	43
6.3.2. Campo de aplicação.....	43
6.3.3. Materiais e Equipamentos	43
6.3.4. Reagentes	44
6.3.5. Preparação de amostra	44
6.3.6. Procedimento	45
6.4. ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos	
(Método de referência).....	45
6.4.1. Objetivo e princípio do método	45
6.4.2. Campo de aplicação.....	46
6.4.3. Materiais e Equipamentos	46
6.4.4. Reagentes	46
6.4.5. Preparação da amostra	46

6.4.6.	Procedimento	47
7.	Resultados e discussão	48
7.1.	ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar- Determinação da matéria gorda.....	48
7.1.1.	Matrizes.....	48
7.1.2.	Precisão	48
7.1.3.	Exatidão	53
7.1.4.	Limite de Quantificação	54
7.1.5.	Gama de trabalho.....	55
7.1.6.	Incerteza.....	55
7.2.	ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado - Determinação do conteúdo total de sólidos	55
7.2.1.	Matrizes.....	55
7.2.2.	Precisão	56
7.2.3.	Exatidão	61
7.2.4.	Limite de Quantificação	62
7.2.5.	Gama de trabalho.....	63
7.2.6.	Incerteza.....	63
7.3.	ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)...64	
7.3.1.	Matrizes.....	64
7.3.2.	Precisão	64
7.3.3.	Exatidão	69
7.3.4.	Limite de Quantificação	70
7.3.5.	Gama de trabalho.....	70
7.3.6.	Incerteza.....	70
7.4.	ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos (Método de referência).....	71
7.4.1.	Matrizes.....	71
7.4.2.	Precisão	71

7.4.3.	Exatidão	75
7.4.4.	Limite de Quantificação	77
7.4.5.	Gama de trabalho.....	77
7.4.6.	Incerteza.....	77
8.	Conclusão.....	79
8.1.	ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar- Determinação da matéria gorda.....	79
8.2.	ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado- Determinação do conteúdo total de sólidos	79
8.3.	ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)...80	
8.4.	ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos (Método de referência).....	81
8.5.	Considerações finais	81
9.	Bibliografia	83
9.	Anexos.....	89
	Anexo A: Rótulo das matrizes compradas.....	89
	Anexo B: Tabelas com testes estatísticos	93
	Anexo C: Tabelas com dados obtidos para cada matriz em cada norma ISO para avaliar a repetibilidade	95
	ISO 17189.....	95
	ISO 6731.....	95
	ISO 7238.....	96
	ISO 5534.....	96
	Anexo D: Tabelas com dados obtidos para cada matriz em cada norma ISO para avaliar a precisão intermédia.....	97
	ISO 17189.....	97
	ISO 6731.....	98
	ISO 7238.....	99
	ISO 5534.....	100
	Anexo E: Cálculos utilizados na estimativa da incerteza	101

Anexo F: Certificados dos Materiais de Referência Certificados (MRC)	103
--	-----

Índice de tabelas

Tabela 1. Composição nutricional de alguns queijos (g/100g). (Adaptado de [17])	12
Tabela 2. Classificação dos iogurtes quanto à composição, aromatização e teor de matéria gorda.(Adaptado de [44])	13
Tabela 3. Matrizes analisadas na validação da norma ISO 17189:2003.	39
Tabela 4. Número de extrações e volume do solvente de extração a ser usado para a separação por centrifugação para as diferentes matrizes	40
Tabela 5. Matrizes a analisar da norma ISO 6731:2010.	42
Tabela 6. Matrizes a analisar da norma ISO 7238:2004.	44
Tabela 7. Matrizes a analisar da norma ISO 5534:2004.	47
Tabela 8. Estudo da repetibilidade para a determinação da matéria gorda, referente à norma ISO 17189.	49
Tabela 9. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 17189.....	49
Tabela 10. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 17189.	50
Tabela 11. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz margarina.	51
Tabela 12. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz margarina (redução do colesterol).	51
Tabela 13. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz manteiga com sal.....	52
Tabela 14. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz manteiga magra.....	52
Tabela 15. Resultados gerais do estudo da repetibilidade para a ISO 17189.	53
Tabela 16. Resultados obtidos nas matrizes analisadas pela norma ISO 17189.	53
Tabela 17.Resultado obtido no ensaio de comparação interlaboratorial.	54

Tabela 18. Avaliação da incerteza do método relativo aos dois MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U_{(Rw,relativo)}$, incerteza associada à componente sistemática $u_{bias,relativo}$, incerteza padrão combinada $u_{relativo}$ e incerteza expandida $U_{relativo}$	55
Tabela 19. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo total de sólidos, referente à norma ISO 6731.	56
Tabela 20. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 6731.	57
Tabela 21. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 6731.	57
Tabela 22. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR UHT Milk 3,5% far (RM CP L M 52).	58
Tabela 23. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13).	59
Tabela 24. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38).	59
Tabela 25. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Leite Magro.	60
Tabela 26. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Leite Meio Gordo.	60
Tabela 27. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Natas Magras.	61
Tabela 28. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 6731.	61
Tabela 29. Resultados obtidos nas matrizes analisadas pela ISO 6731.	62
Tabela 30. – Resultado obtido no ensaio de comparação interlaboratorial.	62
Tabela 31. Avaliação da incerteza do método relativo aos três MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U_{(Rw,relativo)}$, incerteza associada à	

componente sistemática ubias,relativo, incerteza padrão combinada urelativo e incerteza expandida, Urelativo.....	63
Tabela 32. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo de sal, referente à norma ISO 7238.	64
Tabela 33. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 7238.....	65
Tabela 34. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 7238.	65
Tabela 35. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga com sal.....	66
Tabela 36. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga sem sal.....	67
Tabela 37. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga meio sal.....	67
Tabela 38. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga magra.....	68
Tabela 39. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga com alho e salsa.	68
Tabela 40. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 7238.	69
Tabela 41. Resultado obtido na matriz analisada.....	69
Tabela 42. Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial.	69
Tabela 43. Avaliação da incerteza do método relativo ao MRC utilizado: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_w, \text{relativo})$, incerteza associada à componente sistemática ubias,relativo, incerteza padrão combinada urelativo e incerteza expandida, Urelativo.....	70
Tabela 44. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo de sal, referente à norma ISO 5534.	71
Tabela 45. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 5534.....	72

Tabela 46. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 5534.	72
Tabela 47. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz DRRR Processed cheese (M CP L SK 13).	73
Tabela 48. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8).	73
Tabela 49. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo magro.	74
Tabela 50. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo da ilha.	74
Tabela 51. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo flamengo.	75
Tabela 52. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 5534.	75
Tabela 53. Resultado obtido na matriz analisada pela norma ISO 5534.	76
Tabela 54. Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial.	76
Tabela 55. Avaliação da incerteza do método relativo aos dois MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_w, \text{relativo})$, incerteza associada à componente sistemática $u_{\text{bias, relativo}}$, incerteza padrão combinada u_{relativo} e incerteza expandida, U_{relativo} .	78
Tabela 56. Valores críticos para o teste de Grubbs para um nível de significância de 1% e 5%. [75]	93
Tabela 57. Valores críticos para o teste de Cochran referentes ao nível de significância de 5%. [76]	94
Tabela 58. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 17189.	95
Tabela 59. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 6731.	95
Tabela 60. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 7238.	96

Tabela 61. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 5534.	96
Tabela 62. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 17189.	97
Tabela 63. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 6731.	98
Tabela 64. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 7238.	99
Tabela 65. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 5534.	100

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema do trabalho global.	2
Figura 2. Instalações da Silliker Portugal, em Vila Nova de Gaia.	3
Figura 3. Localização dos laboratórios do grupo Mérieux NutriSciences.....	4
Figura 4. Organigrama da Silliker Portugal.	5
Figura 5. Elementos identificadores da descrição de um método de ensaio de rotina aplicado na empresa Silliker.	16
Figura 6. Elementos bibliográficos e normativos de um método de ensaio.	17
Figura 7. Rótulo da margarina Proactiv magra, da marca Becel.	89
Figura 8. Rótulo da manteiga com alho e salsa, da marca Mimosa.	90
Figura 9. Rótulo da manteiga com sal, da marca é Continente.	90
Figura 10. Rótulo da manteiga magra, da marca Continente.	91
Figura 11. Rótulo do Leite Meio-Gordo, da marca Masterchef.	91
Figura 12. Rótulo do Leite Magro, da marca Pingo Doce.....	92
Figura 13. Rótulo das Natas Magras, da marca Páturages.	92
Figura 14. Certificado do MRC FAPAS T14151 Mixed fat spread.	103
Figura 15. Certificado do MRC FAPAS T14167 Mixed fat spread.	103
Figura 16. Certificado do MRC DRRR Evaporated Milk (RM CP L KM 13).	104
Figura 17. Certificado do MRC DRRR Raw Cream (RM CP L R 38).....	104
Figura 18. Certificado do MRC DRRR UHT Milk (RM CP L M 52).....	104
Figura 19. Certificado do MRC DRRR Mild Soured Butter (RM CP L BU 21).	104
Figura 20. Certificado do MRC DRRR Processed Cheese (VI CP L SK 13).....	104
Figura 21. Certificado do MRC DRRR Semi-Hard Cheese (VI CP L SHK 8).....	104

Abreviaturas

C – Valor C de Cochran

CV – Coeficiente de Variação

DCV – Doenças Cardiovasculares

DPCS – *Daily Process Control Sample*

DPR – Desvio Padrão Relativo

ECI – Ensaio de Comparação Interlaboratorial

EIL – Ensaio Interlaboratorial

EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade Industrial

En – Erro normalizado

EN – *European Standards*

ER – Erro Relativo

F – Teste de Fisher

FAPAS - *Food Analysis Performance Assessment Scheme*

G – Valor do teste de Grubbs

IEC - *International Electrotechnical Commission*

IPAC - Instituto Português de Acreditação, I.P

IQ – Impresso da Qualidade

IRMM - *Institute for Reference Materials and Measurements*

ISO - *International Organization for Standardization*

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MG – Matéria Gorda

MRC – Material de Referência Certificado

MUFAs - *Monounsaturated Fatty Acids*

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NP – Norma Portuguesa

PAFQ - Procedimento de Análise Físico-Química

PG – Progressão Geométrica

PUFAs - *Polyunsaturated Fatty Acids*

r – Limite da Repetibilidade

R – Limite da Reprodutibilidade

r_i – Limite da Precisão Intermédia

rpm – rotações por minuto

SA – Sociedade Anónima

SFAs - *Saturated Fatty Acids*

Z – z-score

1. Enquadramento do trabalho

Hoje em dia existe uma grande preocupação por parte das indústrias alimentares em responder às exigências de um mercado cada vez mais competitivo, procurando o máximo de qualidade ao mais baixo custo. Devido à constante evolução deste sector, é de extrema importância ter os dois pilares desta indústria bem definidos: segurança e qualidade alimentar. O tema da segurança alimentar tem assumido nestes últimos anos uma enorme importância, sendo que o seu conceito remete para a “garantia que um alimento não causará dano ao consumidor, através de perigos biológicos, químicos ou físicos, quando é preparado e/ou consumido de acordo com o uso esperado”. [1, 2] O conceito de qualidade encontra-se inequivocamente associado ao sentido de bem-estar, satisfação do cliente, garantia de satisfação e fiabilidade do produto. Os consumidores estão cada vez mais atentos e exigentes à qualidade dos alimentos e aos seus benefícios na manutenção da saúde e prevenção da doença.

De forma a garantir que as empresas alimentares estão bem assentes nestes dois pilares, as análises químicas e biológicas a alimentos estão a tornar-se cada vez mais relevantes e frequentes. Havendo um enorme leque de análises que se podem realizar, a análise nutricional, a identificação e quantificação de aditivos e de contaminantes nos alimentos são as principais. Estas análises são efetuadas com base em métodos analíticos que, apesar de poderem ser procedimentos internos adotados por uma empresa devem, sempre que possível, ser definidos em normas regionais, nacionais ou internacionais. O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido envolve o processo de validação, conferindo a garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. A validação dos métodos resume-se na verificação do cumprimento dos requisitos específicos relativos a um determinado método de ensaio através da realização de exames e técnicas disponíveis. [3-5]

2. Objetivos e esquema do trabalho

De uma forma geral, os objetivos do trabalho consistiram:

- Na aquisição de competências na validação de métodos de análise química, nomeadamente em matrizes de leites, produtos lácteos e derivados, com recurso a técnicas clássicas em contexto de trabalho num laboratório acreditado.

- No acompanhamento de ensaios acreditados implementados no laboratório de Química.
- Na adaptação, conhecimento e utilização dos equipamentos e respetivo software analítico e na utilização das ferramentas do controlo da qualidade implementadas no laboratório.
- Na aquisição de experiência em ambiente empresarial, trabalhando em equipa e avaliando e comparando o desempenho individual com o trabalho feito por analistas mais experientes.

De forma a demonstrar de uma forma sucinta o trabalho que vai ser apresentado, na **figura 1** encontra-se um esquema do trabalho global.

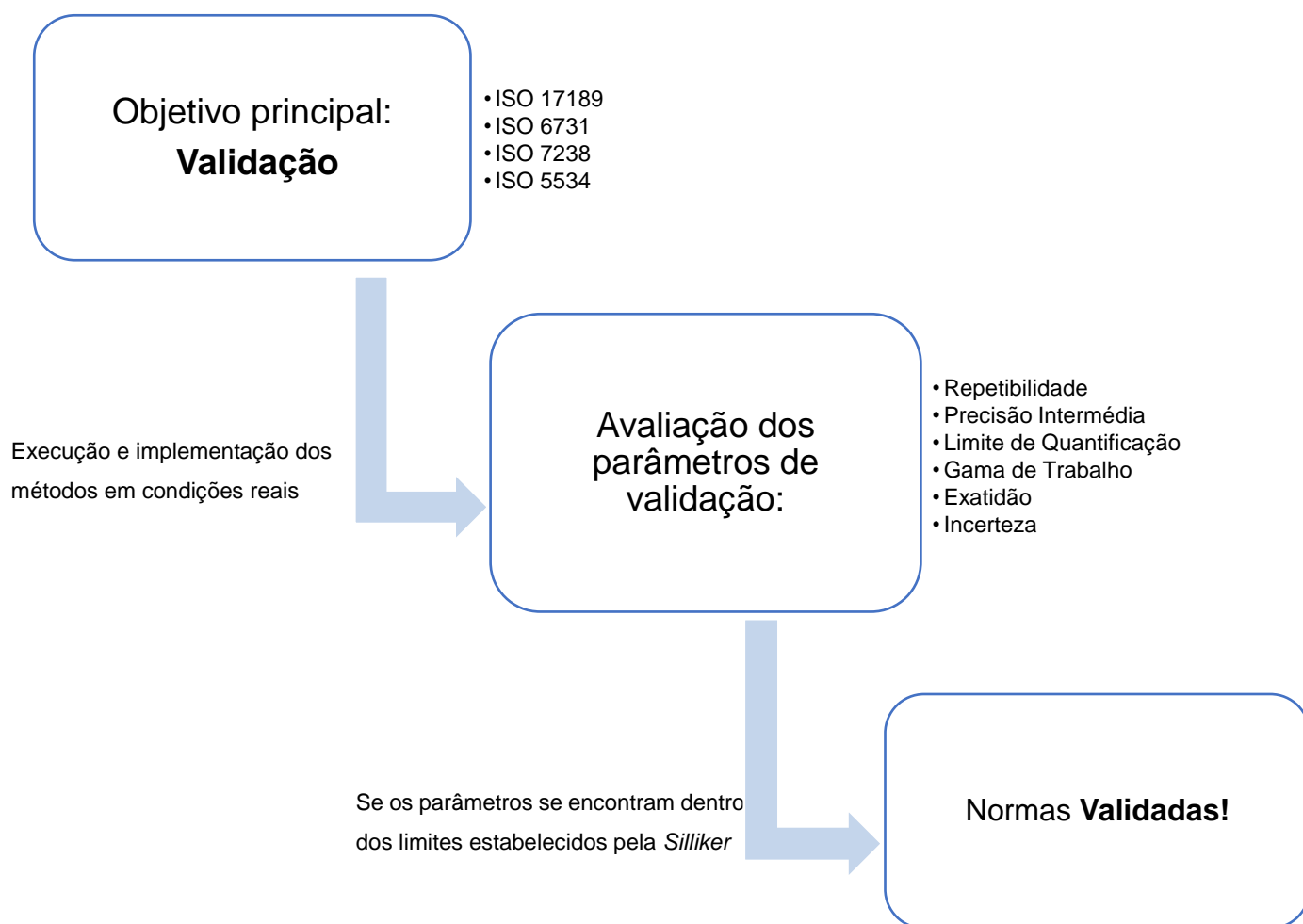


Figura 1. Esquema do trabalho global.

3.A empresa

Sendo líder mundial na prestação de serviços para a melhoria da qualidade e segurança alimentar, a *Silliker*, designada inicialmente como EGI- Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., abriu atividade em Julho de 1992 em Vila Nova de Gaia com o objetivo de encontrar soluções para os desafios atuais do sector agroalimentar. [6]

Em 1993 integraram o Sistema Português da Qualidade através da acreditação do laboratório (certificado de acreditação número L0087), tendo estabelecido políticas e procedimentos de trabalho rigorosos de forma a assegurar a qualidade do serviço prestado ao cliente. Para isso garante que os ensaios realizados são efetuados de acordo com os requisitos dos clientes e respeitando todas as especificações do referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025. Este referencial consiste na demonstração e reconhecimento da competência técnica dos laboratórios e assegura a "precisão, exatidão e repetibilidade" dos resultados analíticos. [6-8]

Em 2005, a empresa passou a situar-se na freguesia de Canelas (**figura 2**), onde construiu novas instalações, sendo estas as atuais.



Figura 2. Instalações da Silliker Portugal, em Vila Nova de Gaia.

O nome *Silliker* Portugal surge em Março de 2008, aquando da compra de 86% da capital da empresa por uma multinacional norte-americana, lançando assim a *Silliker* para um dos maiores grupos mundiais na prestação de serviços na área da qualidade e segurança alimentar. A *Silliker* Portugal é constituída por uma equipa competente e organizada, formada por um grupo de especialistas de diferentes áreas do setor alimentar. Assim a sua estrutura permite oferecer uma ampla gama de serviços, onde se inclui o serviço de

análises microbiológicas, físico-químicas, sensoriais, consultoria, auditorias, inspeções, investigação e tecnologia, embalagens e formações, tendo como objetivo caracterizar e verificar a conformidade dos produtos agroalimentares enviados pelas empresas de prestação de serviços alimentares e os particulares.

As suas instalações estão distribuídas por um único piso onde se encontra a área Administrativa e Laboratorial, sendo esta última área dividida em dois laboratórios separados: Microbiologia e Físico-Química. O laboratório de Microbiologia presta ensaios para verificar a qualidade e segurança microbiológica dos produtos, satisfazendo as exigências e os padrões internacionais a que foi proposto. O laboratório de Físico-Química é constituído por duas unidades independentes, o laboratório de Físico-Química, onde são executadas todas as técnicas da química clássica, e o laboratório de Métodos Instrumentais de Análise, onde são executados ensaios recorrendo-se a técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. [6, 7]

A *Silliker* Portugal é um dos muitos laboratórios acreditados do Instituto Mérieux NutriSciences, sendo o seu foco na segurança e qualidade alimentar. O grupo Mérieux NutriSciences está presente em 21 países (**figura 3**) através de uma rede de mais de 80 laboratórios acreditados segundo a ISO/IEC 17025 e conta com mais de 6.000 colaboradores. [9]



Figura 3. Localização dos laboratórios do grupo Mérieux NutriSciences.

O organigrama da *Silliker* Portugal (**figura 4**) traduz uma estrutura organizada em que a autoridade e responsabilidades de cada elemento se encontram perfeitamente definidas. [6]

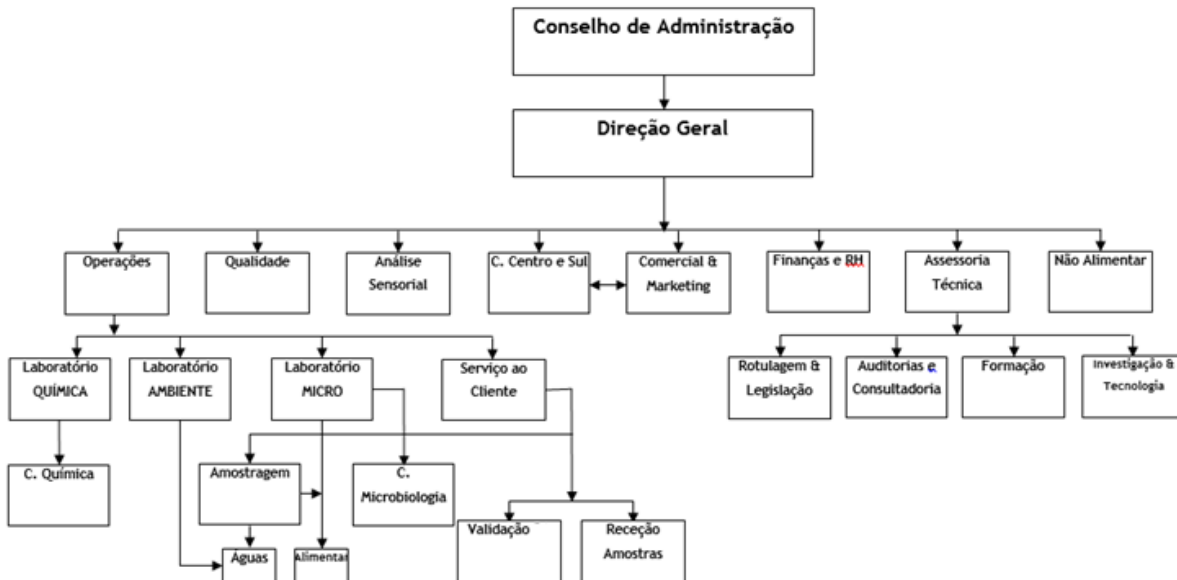


Figura 4. Organigrama da *Silliker* Portugal.

Devido à sua importância a nível mundial no sector agroalimentar, o grupo *Silliker* necessita de garantir a robustez e fiabilidade dos seus resultados analíticos, submetendo-se assim a auditorias anuais, a participações em ensaios de comparação interlaboratorial (ECI) e a procedimentos diários de controlo dos processos como o uso de DPCS (*Daily Process Control Sample*), análises de amostras em duplicado e análises de padrões de controlo. [8]

4. Fundamentos Teóricos

A saúde e a alimentação estão intimamente ligadas, verificando-se atualmente uma preocupação crescente com escolhas alimentares saudáveis e equilibradas, quer em termos nutricionais, quer económicos. No mundo em desenvolvimento, o contínuo crescimento e a urbanização levaram a um aumento do consumo global de alimentos e a mudanças na composição da dieta, com uma proporção crescente de produtos de alto valor, nomeadamente os produtos lácteos. Estes produtos, também denominados por laticínios, são o grupo de alimentos que inclui o leite, assim como os seus derivados processados (geralmente fermentados). A indústria de laticínios foi assim impulsionada proporcionando benefícios nutricionais importantes para grandes segmentos da população dos países em desenvolvimento. Contudo, face à recente crise económica, esta indústria está a ser confrontada com os elevados preços dos alimentos nos mercados globais levando a que muitos milhões dessas pessoas ainda não consigam adquirir dietas de melhor qualidade devido ao seu elevado custo. Atualmente, as indústrias de laticínios representam um dos maiores setores mundiais da indústria de produção alimentar, tendo-se verificado nas últimas décadas inovações tecnológicas que levaram a uma grande variedade de produtos lácteos, alguns dos quais tiveram componentes como gordura e lactose removidos ou reduzidos e outros que foram fortificados com componentes, como ferro, esteróis e vitamina D. Dada a diversidade de produtos lácteos que estão disponíveis no mercado e, considerando a vasta variabilidade nas composições nutricionais, é importante que estejam disponíveis informações precisas para o consumidor de forma a ajudá-lo a fazer escolhas nutricionais informadas. [10-12]

4.1. A importância dos produtos lácteos na saúde

A nutrição e a saúde nos primeiros dois a três anos de vida são importantes para o crescimento e desenvolvimento normal das crianças. [13] Os produtos lácteos são componentes importantes da dieta diária que fornecem energia e, devido à elevada quantidade de nutrientes presente tais como proteína, gordura, minerais e vitaminas, fazem parte das recomendações nutricionais em muitos países, sendo difícil obter este conjunto de nutrientes em dietas onde há um consumo baixo ou inexistente destes produtos. Os alimentos pertencentes a este grupo deverão fornecer cerca de 18% ao dia alimentar, ou seja, 2 a 3 porções diárias. São essenciais não só para o crescimento e manutenção do osso mas também no combate de várias doenças como obesidade, hipertensão, diabetes tipo 2, doença cardiovascular e cancro. No entanto, o papel do leite e dos produtos lácteos na nutrição humana tem sido cada vez mais debatido nos últimos anos, tanto na literatura

científica como na literatura popular. [14-17] De uma forma sucinta, é apresentado de seguida algumas vantagens do consumo de produtos lácteos em diferentes matrizes.

4.1.1. Produtos lácteos e a saúde óssea

Os principais fatores que afetam a massa óssea são o cálcio e a vitamina D, apesar de que outros nutrientes, como potássio, fósforo, zinco, magnésio, vitamina A, C e K e proteína, também desempenham um papel importante. Curiosamente o perfil mineral do leite é muito comum ao dos ossos, sendo poucos os alimentos que contêm naturalmente tanto cálcio como o leite. Uma das vantagens da ingestão de leite é o facto de o cálcio presente neste alimento ter uma elevada biodisponibilidade, sendo facilmente absorvido. Contudo os benefícios, para a saúde óssea, de incluir produtos lácteos na dieta ou riscos da sua exclusão variam com a fase de vida. [18, 19]

4.1.2. Produtos lácteos e a obesidade

A incidência crescente do excesso de peso e da obesidade, devido a um excesso de energia consumida, é um problema de saúde pública global. A etiologia da obesidade é complexa e a avaliação dos padrões alimentares relacionados à obesidade tornou-se cada vez mais comum na epidemiologia nutricional. [20] No entanto, certos padrões alimentares estão associados a um maior risco de obesidade devido ao seu alto conteúdo energético.

Alguns estudos clínicos mostraram que dietas que incluem três porções de produtos lácteos por dia podem potenciar a perda de gordura e reduzir a gordura abdominal em comparação com aquelas que contêm pouca ou nenhuma fonte láctea. Porém este efeito é geralmente observado em indivíduos já obesos e com excesso de peso, quando as calorias são moderadamente restritas e a ingestão de laticínios e de cálcio são aumentadas de inadequadas para adequadas. [21-23] Outros estudos sugerem que a ingestão moderada de proteína, como por exemplo proveniente de produtos lácteos, ao mesmo tempo em que se controla a ingestão total de energia, pode melhorar a composição corporal e melhorar a manutenção do peso corporal uma vez que o aumento deste macronutriente está associado a um aumento da saciedade e da termogénese. [24, 25] Contudo há a necessidade de mais pesquisas nesta área e de estudos de intervenção a longo prazo para confirmar se os produtos lácteos podem aumentar a perda de peso e/ou melhorar a manutenção do peso. Ainda é muito cedo para afirmar uma relação existente entre o consumo de produtos lácteos e as alterações no peso corporal e/ou medidas na adiposidade.

4.1.3. Produtos lácteos e a doença cardiovascular

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos que incluem, entre outras, a doença das artérias coronárias (artérias do coração) e a doença das artérias do cérebro. As DCV matam anualmente 17 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a principal causa de morte a nível mundial. Existem inúmeros fatores de risco das DCV, como o tabagismo, alcoolismo, sendo um dos mais importantes os hábitos alimentares. Estes hábitos alimentares estão associados às altas taxas de mortalidade por DCV se forem caracterizados pelo elevado consumo de manteiga, produtos lácteos e outros produtos animais (excluindo peixe) uma vez que são geralmente ricos em ácidos gordos saturados e colesterol. Um dos melhores estudos que relaciona a dieta com DCV é o *Seven Countries Study*, realizado por Ancel Keys. Neste estudo observaram-se evidências de um efeito benéfico da dieta Mediterrânica sobre as DCV. Esta dieta mediterrânica representa o padrão alimentar dos vários países da bacia do Mediterrâneo, sendo rica em vegetais e fruta, pão de trigo ou outros cereais pouco refinados, azeite e peixe e pobre em gorduras saturadas e em alimentos de origem animal. [26, 27]

O leite e os produtos lácteos são frequentemente ligados ao risco/ocorrência das doenças cardiovasculares devido à gordura do leite, nomeadamente o seu elevado teor de ácidos gordos saturados (SFA). Outros nutrientes no leite também têm sido implicados com o risco de DCV, como a proteína [28], a lactose e o elevado rácio cálcio-magnésio. [29, 30] Contudo outros nutrientes presentes neste alimento, como ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs) e polinsaturados (PUFAs), potássio e fósforo podem modificar os fatores de risco para DCV, estando associados a efeitos anti-hipertensivos. O cálcio é também um nutriente presente nos produtos lácteos e alguns estudos demonstraram que o aumento da ingestão deste nutriente parece reduzir a elevada pressão arterial. [31, 32]

Grande parte dos dados disponíveis diz respeito ao leite, sendo os estudos referentes à relação de outros produtos lácteos com doenças cardiovasculares escassos. Tendo em conta todas estas informações contraditórias, as recomendações atuais feitas pelas autoridades governamentais são o consumo de produtos lácteos com baixo teor de matéria gorda.

4.2. Composição dos diferentes produtos lácteos

4.2.1. Leite

A importância do leite a nível mundial não é de hoje, desde os tempos primordiais que o leite tem sido um alimento essencial na alimentação humana, sendo considerado o primeiro alimento humano e o único que reúne todos os ingredientes necessários à subsistência. É

um alimento versátil do ponto de vista físico-químico, permitindo a fácil integração na alimentação diária, de acordo com as necessidades e preferências individuais em todas as fases do ciclo de vida. Todavia, por se tratar de um alimento bastante nutritivo, é altamente perecível sendo a sua conservação sem intervenção tecnológica praticamente impossível. [33]

A composição do leite e, conseqüentemente, as suas características organolépticas variam em função de alguns aspetos como a sua fonte, a qualidade da alimentação do animal e a frequência da sua ordenha. Frequentemente a vaca é o principal animal associado ao leite, contudo também é consumido leite de outros animais (ovelha, cabra, burra, etc). [33] O leite fornece cerca de 62-64kcal/100g a partir dos seus diversos componentes. As **proteínas** contribuem com cerca de 3 a 3,3% das calorias fornecidas pelo leite, sendo do ponto de vista qualitativo proteínas de alto valor biológico. As principais proteínas são as caseínas (maioritárias) e as proteínas do soro (que incluem a α -lactoglobulina, a β -lactoglobulina, imunoglobulinas e lactoferrina). [17, 34, 35] A **gordura** contribui com 3,5 a 3,7% das calorias fornecidas pelo leite, sendo que o seu teor varia consoante o leite seja gordo, meio-gordo ou magro. A gordura do leite inclui triglicerídeos e, em menor quantidade, ácidos gordos como ácido oleico, palmítico e mirístico, apresentando-se sob a forma de finos glóbulos em emulsão rodeados por uma membrana de fosfolípidos e proteínas que atuam como emulsificante e protegem a gordura da ação de enzimas (incluindo as que estão presentes no leite). Este componente é ainda importante uma vez que serve de meio de transporte para as vitaminas lipossolúveis como a vitamina A, D, E e K. [35, 36] Os **hidratos de carbono** contribuem com cerca de 4,7% das calorias fornecidas pelo leite, sendo o principal açúcar a lactose. A lactose é um dissacarídeo constituído por dois monossacarídeos unidos entre si: a glucose e a galactose. Para ser utilizada pelo nosso organismo, tem de ser dividida nos seus monossacarídeos através da enzima β -galactosidase (lactase) que é produzida na mucosa intestinal, mais precisamente na zona superficial das microvilosidades do intestino delgado. Existem várias complicações entre a população envolvidas com a digestão da lactose devido à falta ou deficiência desta enzima no organismo para a metabolizar. No entanto as inovações tecnológicas levaram à formulação de leite sem lactose, através do seu prévio desdobramento nos seus componentes mais simples. A lactose, para além de fornecer energia, está envolvida na absorção intestinal do cálcio, magnésio e fósforo e na utilização da vitamina D. [37, 38] Os **minerais** encontrados no leite são essencialmente o cálcio (109-119mg/100g) e fósforo (77-93mg/100g), contendo ainda selénio, potássio, zinco, magnésio e iodo. Desempenham funções relacionadas com o crescimento e manutenção dos ossos e tecidos, mas também no transporte eficiente de nutrientes e, conseqüentemente, no funcionamento adequado

do organismo. Um dos minerais mais abundante no leite é o cálcio, sendo que a sua recomendação diária é entre os 1000-1300mg em adultos. Esta associação deve-se ao facto de ser neste alimento que o cálcio é mais biodisponível, sendo melhor absorvido pelo nosso organismo. O cálcio é fundamental para a formação óssea e dos dentes, libertação de neurotransmissores, transmissão nervosa, regulação do músculo cardíaco, entre outras. Quando a sua ingestão diária é insuficiente, o organismo tem de recorrer às reservas de cálcio no esqueleto levando a uma depleção óssea. Nos dias de hoje, devido às recentes inovações tecnológicas, existe leite ao qual foi adicionado cálcio com o fim de atingir as necessidades deste micronutriente, principalmente em indivíduos que consomem poucos laticínios ou outros alimentos ricos em cálcio. O leite é ainda uma fonte de **vitaminas** como vitamina D (0,05µg/100g), vitamina E (29mg/100g) e vitaminas do complexo B: as vitaminas B6 (0,039-0,042mg/100g), B1 (0,038-0,040mg/100g), B3 (0,084-0,20mg/100g), B9 (1-5µg/100g) e B5 (0,31mg/100g). Apesar desta grande variedade de vitaminas, as principais no leite são a vitamina A (31-59µg/100g), a vitamina B12 (0,18-0,36µg/100g) e a B2 (0,14-0,16mg/100g). A vitamina A está naturalmente presente na gordura do leite, sendo importante para o crescimento, funcionamento do sistema imunitário e órgãos reprodutores. Contribui para a formação dos ossos e dentes, melhora a visão e ainda protege a pele e as mucosas de infeções. Relativamente às vitaminas B12 e B2, estas são essenciais para a produção e crescimento de células sanguíneas e das hormonas produzidas pelas glândulas supra-renais, respetivamente. [35, 39, 40]

De maneira geral, o leite reúne uma série de características que lhe permitem ser considerado um alimento funcional, como ser um alimento de elevado valor nutricional com uma matriz facilitadora para a incorporação de nutrientes.

4.2.2. Manteiga e Margarina

A manteiga é considerada um produto lácteo de origem animal, sendo um produto sólido quando refrigerado e com uma consistência mais mole à temperatura ambiente, derretendo a 32-35°C. Normalmente é produzida a partir de natas fermentadas, previamente extraídas do leite cru. À medida que o leite é pasteurizado, alcança-se a fermentação através da adição de culturas iniciadoras de bactérias ácido-láticas, pertencentes aos géneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Estirpes selecionadas podem acumular metabolitos secundários da fermentação da lactose e do citrato, como o diacetilo e certos aldeídos, responsáveis pelo aroma típico da manteiga. Assim, a manteiga é produzida pela agitação das natas, que leva à rutura da membrana de fosfolípidos que aprisiona os triglicerídeos e permite que a gordura do leite se ligue. Este processo leva à formação de pequenos grãos de manteiga, que depois são prensados e amassados todos juntos resultando na manteiga.

A sua cor varia de amarelo pálido a forte, dependendo da alimentação do gado, mas pode ser manipulado industrialmente através da adição de carotenos ou de corante anato. De maneira a aumentar o tempo de prateleira e ativar certos sabores, geralmente é adicionado sal. Outro tipo de manipulação industrial passa pelo aumento da proporção de água na emulsão para produzir as manteigas magras.

No geral, a manteiga fornece cerca de 739kcal por 100g de produto. A **gordura** é o principal componente deste produto lácteo, contribuindo com 81,8% das calorias fornecidas. Esta é composta maioritariamente por ácidos gordos saturados, seguido de ácidos gordos monosaturados e polinsaturados, e por colesterol. As **proteínas** contribuem com cerca de 0,1 a 0,85% das calorias fornecidas e os **hidratos de carbono**, nomeadamente a lactose, com cerca de 0,06 a 0,7%. A manteiga é uma fonte rica em **vitaminas lipossolúveis**, particularmente vitamina A (565 a 671µg/100g), D (0,74 a 1,5µg/100g) e E (2,0 a 2,32mg/100g), e β-caroteno (0,16 a 45mg/100g) que fornece um tom natural de amarelo. Em relação aos **minerais**, a manteiga fornece muito menos cálcio que o leite, uma vez que a maior parte é removido com a fração proteica. [35]

Por outro lado, e muitas vezes comparada com este último produto lácteo, aparece a margarina. A margarina é um produto de origem vegetal, obtida principalmente a partir de óleos e gorduras vegetais, sendo uma emulsão líquida constituída com pelo menos 80% de **gordura**. Este produto está a ser cada vez mais utilizado devido às vantagens que oferece sobre a manteiga em relação à sua composição em termos da gordura: a margarina não contém colesterol e tem menos ácidos gordos saturados, contudo a composição em ácidos gordos da margarina depende da fonte de gordura utilizada, do processo de produção, entre outros. Como já referido, o teor de gordura da margarina pode ser tão elevado como o da manteiga, por isso é cada vez mais usual encontrar margarinas com teor de gordura reduzido. [41, 42]

4.2.3. Queijo

O queijo é um alimento antigo, apresentando alto valor nutricional devido aos seus elevados níveis de proteína, gordura, cálcio e fósforo. Existem centenas de tipos de queijo diferentes com uma vasta gama de sabores, texturas e formas. [35] De uma forma generalizada, segundo o *Codex Alimentarius*, o queijo é um produto macio, semiduro, duro ou extra-duro amadurecido ou não, que pode ser revestido e em que o rácio proteínas do soro/caseína não exceda o rácio presente no leite. Pode ser obtido (a) pela coagulação completa ou parcial da proteína do leite desnatado, parcialmente desnatado, das natas, da mistura entre estes materiais, entre outros, através da ação do coalho ou de outros agentes de coagulação adequados e pela drenagem parcial do soro resultante da coagulação,

respeitando sempre o princípio de que a produção de queijo resulta numa concentração de proteína do leite (em particular da porção de caseína) e que, consequentemente, o teor de proteína deste produto lácteo será claramente superior ao conteúdo de proteína da mistura dos produtos anteriormente descritos a partir da qual o queijo foi produzido; e/ou (b) por técnicas de transformação que envolvam a coagulação da proteína do leite e/ou de outros produtos obtidos a partir do leite que dão um produto final com características físicas, químicas e organoléticas semelhantes ao produto definido na alínea (a). [43]

Devido aos inúmeros tipos de queijo existentes, torna-se difícil generalizar o seu conteúdo nutricional. Assim, a **tabela 1** apresenta esta informação em alguns queijos mais comuns.

Tabela 1. Composição nutricional de alguns queijos (g/100g). (Adaptado de [17])

		Energia (kcal)	Proteína (g)	Gordura (g)	Lactose (g)
Queijo Azul	Média	356	21,0	29,9	0,4
	Gama	324-410	19,1-23,7	27,1-35,0	0,1-1,0
Brie	Média	331	20,0	27,9	0,3
	Gama	319-343	19,3-20,8	26,9-29,1	0,1-0,45
Cheddar	Média	406	25,1	33,7	0,3
	Gama	381-427	24,2-26,2	31,0-36,6	0,1-0,5
Gouda	Média	338	23,0	26,6	2,2
	Gama	320-356	21,2-24,9	25,8-27,4	2,2
Edam	Média	353	26,6	27,1	0,8
	Gama	341-360	25,0-28,1	26,0-27,8	0,1-1,4
Feta	Média	254	16,1	20,2	1,8
	Gama	249-264	14,2-19,4	19,2-21,3	0,5-4,1
Mozzarella	Média	275	22,1	20,3	0,5
	Gama	253-300	16,7-28,9	17,7-24,4	0,1-1,0
Parmesão	Média	402	37,6	27,2	0,5
	Gama	356-444	33,6-44,9	24,1-29,7	0,1-0,9

4.2.4. Iogurte

De acordo com a portaria nº 742/92 de 24 de Julho, o iogurte é um produto coagulado, obtido por fermentação láctica devido à ação exclusiva de *Lactobacillus bulgaricus* e

Streptococcus thermophilus sobre o leite ou produtos lácteos (leite pasteurizado, leite pasteurizado parcialmente desnatado, leite pasteurizado desnatado ou nata pasteurizada) com ou sem a adição de leite em pó ou derivados, açúcares e edulcorantes, devendo a flora específica estar viva e abundante no produto final (igual ou superior a 10^7 /g). [44]

Existem 3 tipos de iogurtes: o sólido, considerado o iogurte tradicional que é coagulado na própria embalagem, natural ou aromatizado; o batido, iogurte coagulado em tanque, agitado e arrefecido antes de embalado sendo cremoso, natural ou adicionado de pedaços ou polpa de fruta; e o líquido, iogurte liquefeito depois de coagulado, seguido de arrefecimento e embalagem, sendo cremoso com adição de aromas ou polpa. Dentro destes tipos, os iogurtes podem ser classificados quanto à sua composição, aromatização e conteúdo de matéria gorda. A classificação encontra-se na **tabela 2**.

Tabela 2. Classificação dos iogurtes quanto à composição, aromatização e teor de matéria gorda. (Adaptado de [44])

Classificação de iogurtes	
Composição	
Natural	Apenas com a adição de leite e culturas microbianas iniciadoras
Açucarado	Com adição de sacarose ou outros açúcares, edulcorantes e emulsionantes
Aromatização	
Pedaços	Adição de pedaços de fruta
Aromatizados	Adição de aromas
Polpa	Adição de polpa de fruta
Outros	Adição de: mel, café, chocolate, sementes, cereais, etc.
Matéria gorda	
Magro	Teor máximo: 0,3% (m/m)
Meio-gordo	Teor mínimo: 1,5% (m/m) e Teor máximo: 1,8% (m/m)
Gordo	Teor mínimo: 3,5% (m/m)

A produção do iogurte tem início na seleção das matérias-primas, em que após a sua receção, são analisadas e é garantida a sua elevada qualidade. Em geral, o leite utilizado tem um conteúdo de gordura e sólidos totais padronizados, a fim de obter produtos finais consistentes. Este é homogeneizado e tratado termicamente, sendo os tratamentos térmicos típicos de 85°C durante 30 minutos ou 95°C durante 5 minutos. O leite é depois arrefecido a 42°C, inoculado com culturas descritas anteriormente e incubado a 42°C durante cerca de 4,5h. Esta última etapa é importante para diminuir o pH até cerca de 4,6

pela fermentação da lactose em ácido láctico através das culturas microbianas. O passo de aquecimento leva à desnaturação de proteínas de soro de leite. Estas proteínas, juntamente com as caseínas, precipitam a pH baixo, levando às propriedades associadas com iogurte. [17]

O valor nutricional dos diferentes tipos de iogurte é variável, dependendo da sua composição, aromatização e teor de matéria gorda. Um iogurte normal natural fornece cerca de 54-63 kcal/100g. As **proteínas** contribuem com cerca de 4,2 a 5,2% das calorias fornecidas, sendo de elevado valor biológico. Geralmente o conteúdo de proteínas do iogurte é superior ao do leite devido à adição de leite desidratado durante o seu processamento e a proteína presente no iogurte é mais facilmente digerida do que a do leite devido à ação proteolítica das culturas lácteas e do tratamento térmico que promove a coagulação das proteínas do leite. Os **hidratos de carbono**, maioritariamente açúcares (sendo o principal a lactose), contribuem com cerca de 5,0 a 7,0%. A quantidade de lactose é menor que a do leite uma vez que esta é degradada durante o processo de fermentação ou pela enzima lactase, produzida por algumas bactérias intervenientes na produção de iogurte. A **gordura** contribui com cerca de 1,6 a 1,8%, sendo esta fração maioritariamente constituída por ácidos gordos saturados (1,0%), com predominância de ácidos gordos com 14 a 18 carbonos. Os ácidos gordos monoinsaturados também estão presentes (0,4%), sobretudo ácido oleico (C18:1), assim como os polinsaturados (44mg a 0,1g/100g). O iogurte é uma boa fonte de **vitaminas**, como a vitamina A (14 a 30µg/100g), vitamina B2 (0,21 a 34g/100g) e vitamina B12 (0 a 0,56µg/100g). Algumas perdas de vitaminas podem ocorrer durante o processamento deste produto lácteo quer devido ao tratamento térmico e físico quer pela sua utilização por parte das bactérias. Contudo, as bactérias são capazes de produzir outras vitaminas como vitamina B9. Relativamente aos **minerais**, o iogurte contém cálcio (118 a 183mg/100g) e vestígios de fósforo (12µg/100g) e selénio (3,3µg/100g). Para além de ser uma boa fonte de cálcio, o consumo deste produto lácteo facilita a absorção deste mineral pelo organismo por apresentar um pH inferior ao do leite. [17, 35, 45]

4.2.5. Natas

As natas são um dos produtos lácteos mais importantes. São caracterizadas por uma emulsão óleo-em-água contendo glóbulos de gordura de leite, sendo separada deste por forças gravitacionais ou centrífugas. As suas propriedades físico-químicas são afetadas por diversos fatores, como o estado dos glóbulos de gordura, a concentração destes glóbulos, o tipo e concentração de outros ingredientes presentes (como emulsificantes, estabilizantes, sal, etc), da temperatura e da manipulação física das natas, entre outros.

O valor nutricional varia conforme os diferentes tipos de natas, classificados de acordo com o seu teor de matéria gorda. Tipicamente as natas apresentam um conteúdo de **gordura** entre 18-26%, sendo este constituído maioritariamente por triglicerídeos. Outros componentes minoritários presentes nesta fase lipídica são diacilglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos gordos livres, esteróis e fosfolípidos. Em relação às **proteínas**, as natas apresentam micelas de caseína e proteínas do soro do leite, que retêm a sua composição nativa na fase aquosa após a separação da nata. [46, 47]

4.2.6. Leite evaporado

O leite evaporado, conhecido também como leite condensado não açucarado, é um produto lácteo onde 60% da água é retirada do leite fresco. O seu processo de formação envolve a evaporação da água a partir do leite, seguido de homogeneização, estabilização, embalagem e esterilização pelo calor (115-118°C durante 15 minutos). De acordo com o Código de Regulamentos Federais dos Estados Unidos, o leite evaporado contém pelo menos 6,5% (m/m) de **matéria gorda** láctea. [48]

5. Validação de métodos na análise química

“A primeira razão da existência de um laboratório químico é a necessidade de obter resultados de análises químicas. No entanto, esta missão só será cumprida se os resultados produzidos tiverem a qualidade adequada ao uso que lhes vai ser dado.” [5]

A caracterização de um método analítico num laboratório consiste na descrição das suas características funcionais através de parâmetros de desempenho e validação. Segundo a NP EN ISO/IEC 17025:2005, a validação de uma metodologia analítica é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma utilização pretendida são satisfeitos. Ou seja, o objetivo da validação passa por demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito, sendo aplicada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos. [5, 49-51]

O processo de validação é contínuo e segue um plano definido, onde deve documentar toda a abordagem e todos os passos efetuados durante a validação do método. Quando a validação é realizada corretamente, esta garante uma execução consistente e eficaz do método de ensaio. [52]

Para validar um método de ensaio, o primeiro passo é fazer a sua descrição e caracterização. A descrição deve ser feita em documentos, de forma detalhada, que apresentem:

- Título ou designação do ensaio;
- Código identificador do ensaio;
- Revisão/edição;
- Data de entrada em vigor e responsáveis pela sua elaboração e aprovação;
- Número de cada página e número total de páginas.

Um exemplo dos elementos identificadores da descrição de um método de ensaio encontra-se na **figura 5**:

Validação de métodos em análise química		Código: PCQ.34
Procedimento relativo ao controlo da qualidade (PCQ)		Revisão: 4
Emitido por:	Aprovado por:	Página 1/41
		Data de emissão: 2016-04-07

Figura 5. Elementos identificadores da descrição de um método de ensaio de rotina aplicado na empresa Silliker.

De seguida devem ser demonstrados os elementos descritivos do método, que são:

- Resumo ou princípios teóricos da determinação indicando as grandezas dominantes no resultado;
- Campo de aplicação;
- Equipamento, material e reagentes;
- Processo de calibração (utilização de padrões, ensaios de referência ou em branco, curva de calibração, etc)
- Procedimento (condições operatórias, ambientais, critérios de aceitação/rejeição, etc)
- Cálculo dos resultados (fórmulas, tratamento dos dados, apresentação de resultados, etc)

Por último, também devem ser demonstrados os elementos bibliográficos e normativos.

Estes dois últimos conjuntos de elementos podem ser visualizados na **figura 6**:

0. ÍNDICE	
0. ÍNDICE	1
1. OBJETIVO	2
2. CAMPO DE APLICAÇÃO	2
3. HISTÓRICO DAS REVISÕES	2
4. TERMOS E DEFINIÇÕES	4
5. RESPONSABILIDADES	7
6. PROCEDIMENTO	8
6.1 AVALIAÇÃO INDIRETA	8
6.1.1 Especificidade/seletividade	8
6.1.2 Quantificação	9
6.1.3 Precisão	13
6.2 AVALIAÇÃO DIRETA/EXATIDÃO	20
6.2.1 Materiais de referência certificados (MRC)	20
6.2.2 Ensaios de comparação interlaboratorial (ECI)	22
6.3 INCERTEZA DO MÉTODO	22
6.4 RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	23
6.5 GESTÃO DOS ENSAIOS DO ÂMBITO DA ACREDITAÇÃO FLEXÍVEL GLOBAL	23
6.5.1 Responsáveis pela aprovação técnica dos ensaios da lista associada à acreditação flexível	23
6.5.2 Validação dos ensaios do âmbito da acreditação flexível	24
7. DOCUMENTOS ASSOCIADOS	24
7.1 IMPRESSOS	24
7.2 PROCEDIMENTOS	25
8. SEGURANÇA	25
9. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA	25
9.1 REFERÊNCIA À ISO 9001 SISTEMAS DE GESTÃO DA QUALIDADE, REQUISITOS	25
9.2 REFERÊNCIA A OUTRAS NORMAS ISO RELEVANTES	26
9.3 REFERÊNCIA A OUTROS DOCUMENTOS RELEVANTES	26

Figura 6. Elementos bibliográficos e normativos de um método de ensaio.

Quando é necessário e aplicável, devem existir documentos complementares sobre:

- Amostragem (colheita, preparação, conservação e acondicionamento das amostras):

- Características do método utilizado pelo laboratório;
- Precauções de segurança;
- Validação do método;
- Validação e controlo do “Software” (cálculos e apresentação de resultados);
- Controlo de aplicação em rotina;
- Cálculo das incertezas.

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio, que são métodos que não seguem uma norma de ensaio ou documento normativo equivalente, dependem do tipo de método em causa e compreendem no mínimo o estudo e conhecimento dos parâmetros: limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermédia e incerteza. O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta, devendo abranger pelo menos as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido. [5]

5.1.1. Avaliação indireta

5.1.1.1. Seletividade e Especificidade

A seletividade de um método analítico é a capacidade de um método distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes (interferentes). Estes são todas as substâncias que, estando presentes na amostra, são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito e assim provocar desvios sistemáticos. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado mas depende, no entanto, do tipo de compostos a analisar.

A especificidade é a capacidade que um método analítico tem de quantificar de forma correta, exclusiva e inequívoca um determinado analito relativamente a outras substâncias presentes na amostra a analisar, garantindo que a grandeza medida provém apenas do analito.

De forma a avaliar as interferências, poder-se-á efetuar um teste de recuperação utilizando um conjunto de amostras, com a mesma matriz, onde se varia apenas a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho, uma análise de padrões adicionados com espécies químicas que se suspeitam ser possíveis interferentes e diluições sucessivas da amostra e verificação da existência de concordância entre os resultados.

Um método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%, normalmente entre 80 e 120%. Em determinadas situações é possível

que este intervalo seja mais aumentado de acordo com as características do método e para outros esses intervalos podem até ser mais reduzidos. [3, 5, 53]

5.1.1.2. Quantificação

5.1.1.2.1. Curva de Calibração

A calibração, em análises quantitativas, indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Deve ser sempre efetuada aquando da análise, devendo existir critérios para a aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre calibrações definidos internamente. É recomendado o uso da norma ISO 8466-1 para a referência de calibrações analíticas, nomeadamente para efetuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados. Na elaboração de uma curva de calibração os padrões devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho e o branco (solução com todos os reagentes, com exceção do analito em estudo) é muitas vezes diferente de zero, devendo ser incluído na curva. [5, 54]

Para aceitar uma curva de calibração devem estar definidos os seguintes critérios:

Coeficiente de correlação

O coeficiente de correlação (ρ) tem que ter, no mínimo, dois noes seguidos de um cinco. O coeficiente de correlação é dado pela **equação 1**:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2] \cdot [\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (1)$$

Onde a média de x , \bar{x} , corresponde à média dos valores de concentração dos padrões e a média de y , \bar{y} , corresponde à média dos valores da resposta do aparelho. O coeficiente de correlação pode tomar valores entre -1 e $+1$, sendo que o valor de $\rho = +1$ caracteriza uma correlação positiva (reta de declive positivo) e o caso contrário representa uma correlação negativa (reta de declive negativo).

Declive

O declive tem que cumprir com os limites estabelecidos na respetiva carta de controlo e a representação gráfica tem de ser uma reta. A forma algébrica da equação de uma reta é dada pela **equação 2**:

$$y = ax + b \quad (2)$$

Em que **a** representa o declive da reta e **b** a ordenada na origem. A reta de calibração é aceite desde que o declive obedeça aos critérios definidos no impresso da qualidade nº77. Segundo este impresso, os critérios passam pelo declive estar entre o intervalo $\bar{x} \pm 3\sigma$, sendo que estes parâmetros estão mencionados na carta de controlo válida até ao momento. [5, 55, 56]

Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações onde o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade através do método analítico aplicado. A gama de trabalho muitas vezes já se encontra definida em literatura, sendo o seu estudo não obrigatório. Quando o método apresenta uma boa linearidade, é suficiente construir uma curva de calibração e a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias, sendo recomendado utilizar dez pontos de calibração (não devendo ser em número inferior a cinco) distribuídos de igual modo no intervalo de concentrações segundo a ISO 8466-1. Para métodos que não envolvam curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá ser função de alguns fatores como a quantidade de amostra disponível, da boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos no caso de volumetrias. Para realizar o teste de homogeneidade de variâncias é necessário, inicialmente, determinar as variâncias associadas ao primeiro (S^2_1) e ao último padrão (S^2_{10}) pela **equação 3**:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (3)$$

Em que a média é dada pela **equação 4**, para $i=1$ e $i=10$:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (4)$$

Sendo:

- i- O número do padrão (neste caso vai de 1 a 10).
- j- O número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são analisadas para examinar se existem diferenças significativas nos limites da gama de trabalho efetuando o cálculo do teste PG, onde podem ocorrer duas situações:

a) $PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}$, quando $S_{10}^2 > S_1^2$:

$$b) PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2;$$

Compara-se este valor PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para n-1 graus de liberdade:

- Se $PG \leq F$, então não existem diferenças significativas entre as variâncias e a gama de trabalho está bem ajustada:
- Se $PG > F$, então existem diferenças significativas entre as variâncias e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias cumpra o critério anterior. [5, 54, 57, 58]

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em estudo, dentro de uma determinada gama de trabalho, e é obtida por padronização interna ou externa, representada por uma expressão matemática (equação da regressão linear) que vai ser utilizada no cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. É avaliada através da representação gráfica da função do cálculo e quando se verifica uma relação linear, a aplicação do método dos mínimos quadrados é o mais adequado permitindo o cálculo dos coeficientes da reta e respetivos parâmetros estatísticos (desvios padrão residual, $S_{y/x}$). Pelo método dos mínimos quadrados, demonstra-se que os coeficientes **a** (declive) e **b** (ordenada na origem) da reta de regressão de y em x ($y = ax + b$), são dados pela **equação 5 e 6**:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

$$b = \bar{y} - a \cdot \bar{x} \quad (6)$$

Sendo:

x_i - Valores individuais da concentração;

y_i - Valores individuais do sinal instrumental;

\bar{x} - Média de valores de concentração dos padrões utilizados;

\bar{y} - Média de valores do sinal instrumental.

Os coeficientes **a** e **b** fornecem uma estimativa da verdadeira função, que é limitada pela dispersão do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ($S_{y/x}$) da reta de regressão, como mostra a **equação 7**:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + a \cdot x_i)]^2}{N - 2}} \quad (7)$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração. [5, 59, 60]

5.1.1.2.2. Limiares analíticos

Existem várias formas de calcular os limiares analíticos. Estes deverão ser avaliados e atualizados sempre que o laboratório considere necessário ou em situações específicas como uma alteração de equipamento, mudança de instalações, entre outros. Os limites de decisão, deteção e quantificação estabelecem os extremos inferiores e superiores da curva de calibração, sendo de seguida descritos. Estes limites são calculados com base na incerteza da quantificação do analito e podem ser obtidos através de réplicas do branco, da incerteza dos parâmetros da curva de calibração ou da incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração. [3, 5]

Limite de deteção

O limite de deteção corresponde ao teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável, ou seja, corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não quantificada como valor exato uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos. O valor do limite de deteção poderá apresentar diferentes valores para um mesmo procedimento analítico em função do tipo da amostra a analisar. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência completa do analito a medir, apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor.

Em termos qualitativos, o limite de deteção é a concentração que corresponde ao menor sinal instrumental que é estatisticamente distinto do valor obtido pelo branco para o nível de significância de 5% (intervalo de confiança de 95%), assumindo um erro do tipo α (que é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra)=0.05 e um erro do tipo β (que é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise quando ele de facto existe)=0.05.

Em termos quantitativos:

- a) No geral, o limite de deteção é obtido pela **equação 8**:

$$LD = X_0 + 3,3 \sigma_0 \quad (8)$$

Sendo:

X_0 - Média aritmética de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho;

σ_0 - Desvio padrão associado a X_0 .

- b) Quando o método de análise utiliza uma calibração linear, o limite de deteção é dado pela **equação 9**:

$$LD = \frac{[3,3 S_{y/x}]}{a} \quad (9)$$

Onde:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração (relacionado com o método dos mínimos quadrados);

a- declive da reta de calibração. [5, 60]

Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, quando a curva de calibração já se encontra bem definida ou verificada, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). O limite de quantificação pode ser estimado através de réplicas de brancos, através da equação da curva de calibração (por recurso ao valor de interseção da reta e correspondente incerteza), ou pelo quociente sinal/ruído da linha de base (em regra, 10/1). Após ter sido determinado, este limite deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória.

Em termos quantitativos:

- a) No geral, o limite de quantificação é obtido pela **equação 10**:

$$LQ = X_0 + 10 \sigma_0 \quad (10)$$

Sendo:

X_0 - Média aritmética de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 a 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho;

σ_0 - Desvio padrão associado a X_0 .

- b) Quando o método de análise utiliza uma calibração linear, o limite de quantificação é dado pela **equação 11**:

$$LQ = \frac{[10 S_y]}{a} \quad (11)$$

Onde:

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração;

a- declive da reta de calibração. [5, 61]

Limite de decisão

O limite de decisão é a concentração mínima do analito que corresponde a um sinal incerto, com probabilidade de cometer um erro do tipo α de 5% e um erro do tipo β de 50%. [60]

5.1.1.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método, ou equipamento, distinguir pequenas diferenças de concentração do analito, podendo ser definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente aquele acréscimo (**equação 12**).

$$Sensibilidade = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (12)$$

Em métodos que envolvam uma curva de calibração linear, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem dessa curva numa determinada zona de concentração, ou seja, corresponde ao declive dessa curva que relaciona os resultados y obtidos com a concentração ou quantidade de componente x a determinar. A sensibilidade apresenta um valor constante ao longo de toda a gama de trabalho. Se a curva de calibração for definida por uma função quadrática (polinómio de 2º grau do tipo $y = c.x^2+d.x+e$), a sensibilidade será dada por $y = 2.c.x+d$ nesse ponto de concentração, ou seja, a derivada do polinómio.

Num método com elevada sensibilidade uma pequena alteração na concentração do analito resulta numa alteração significativa no sinal obtido. A sensibilidade é importante

quando se quer averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo, quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para um mesmo analito e quando se compara a sensibilidade para vários analitos. [5, 62]

5.1.1.3. Precisão

Segundo a ISO 3534, a precisão corresponde à concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas. Ou seja, pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão varia com a gama de concentrações, sendo recomendado ser estudada em, pelo menos, três níveis de concentração: baixa, intermédia e alta.

A análise deste parâmetro permite avaliar a qualidade dos resultados tendo em consideração possíveis erros aleatórios. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão, existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia. [5]

5.1.1.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como o mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e/ou mesmos intervalos de tempo. Pode ser determinada recorrendo a um ensaio interlaboratorial, onde o número de medições em cada nível de concentração poderá ser inferior ($n \geq 2$), ou um ensaio realizado no próprio laboratório, onde se deve proceder a uma série de medições ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Em ambas as situações, o cálculo é realizado separadamente para cada nível de concentração a partir dos resultados obtidos após a eliminação dos valores aberrantes.

Estimativa da variação (S_r^2) de um método pode ser determinada pela média ponderada das estimativas das variações de w séries de análises estudadas em condições de repetibilidade. A variância associada a este parâmetro, para cada nível i de concentração é (equação 13):

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \cdot S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)} \quad (13)$$

Sendo:

S_{ri}^2 - Variância da repetibilidade associada aos resultados de cada laboratório;

S_{wi}^2 - Variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório;

$(n_{wi}-1)$ - Graus de liberdade da série de análises;

P- O número de laboratórios participantes ou série de ensaios realizados no laboratório.

O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, realizados nas mesmas condições. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) é estimado segundo a **equação 14**:

$$r = 2,8 * S_{ri} \text{ (14)}$$

Onde S_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), também conhecido como desvio padrão relativo da repetibilidade (DPRr), para cada nível de concentração, expresso em percentagem, é dado pela **equação 15**: [5, 62]

$$CVr = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100 \text{ (15)}$$

5.1.1.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade representa a precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes equipamentos, e/ou épocas diferentes. O objetivo da reprodutibilidade é verificar a homogeneidade de resultados quando uma mesma amostra é realizada por um mesmo método, mas variando as condições de medição. Pode ser obtida a partir de ensaios interlaboratoriais, sendo o cálculo efetuado para cada nível, separadamente, após a eliminação dos valores aberrantes. Uma série de amostras é enviada aos p laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra.

O valor da variância associada à reprodutibilidade (S_{Ri}^2) é calculado da seguinte forma (**equação 16**):

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \text{ (16)}$$

Onde:

S_{Li}^2 - Variância Interlaboratorial (**equação 17**);

S_{ri}^2 - Variância da repetibilidade (**equação 18**).

$$S_{Li}^2 = \frac{S_{di}^2 - S_{ri}^2}{\bar{n}_i} \quad (17)$$

$$S_{di}^2 = \frac{1}{p-1} \cdot \sum_{w=1}^p n_{wi} \cdot (\bar{x}_i - \bar{x}_i)^2 \quad (18)$$

$$\bar{n}_i = \frac{1}{p-1} \cdot \left[\sum_{wi=1}^p n_{wi} - \frac{\sum_{w=1}^p n_{wi}^2}{\sum_{w=1}^p n_{wi}} \right] \quad (19)$$

Sendo:

S_{ri}^2 - Variância de repetibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

S_{wi}^2 -Variância associada aos resultados considerados, para cada Laboratório;

n_{wi} - Número de ensaios efetuados pelo Laboratório para um determinado nível de concentrações;

\bar{x}_{wi} - Média aritmética dada pelo Laboratório para um determinado nível de concentração (quando apresenta dois traços por cima em vez de um, significa que é a média das médias dessa grandeza).

Uma nota a ter em conta é que, no caso da variância interlaboratorial (S_{Li}^2) seja negativa assume-se que esta toma o valor de zero.

O limite de reprodutibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas e permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da cópia das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa. O limite de reprodutibilidade (**R**) para um nível de confiança de 95% é avaliado da seguinte forma (**equação 20**):

$$R = 2,8 * S_{Ri} \quad (20)$$

Onde S_{Ri} é o desvio padrão de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada Laboratório.

O coeficiente de variação da reprodutibilidade (CV_R), expresso em percentagem, é dado pela **equação 21**: [5, 52, 60]

$$CV_R = \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} * 100 \quad (21)$$

5.1.1.3.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra (ou amostras idênticas), utilizando o mesmo método e no mesmo laboratório, mas fazendo variar uma ou mais condições como ser em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Este parâmetro permite avaliar o impacto das alterações que poderão ocorrer no dia-a-dia do laboratório e é reconhecido como o mais representativo da variabilidade dos resultados do laboratório. Na maioria dos casos o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio, sendo o seu cálculo efetuado a partir dos resultados analíticos obtidos após a eliminação dos resultados aberrantes. Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo deste parâmetro de qualidade, nomeadamente através de Cartas de Controlo de Amplitudes, que poderão ser aplicadas, entre outras, para réplicas, para duplicados de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo ou através do cálculo do desvio padrão de precisão intermédia, de acordo com a ISO 5725-3. Neste caso, a determinação da precisão intermédia é feita através da recolha de n valores de m ensaios de amostras ou padrões. De acordo com esta norma ISO o método considera-se preciso em termos de precisão intermédia se o coeficiente de variação for inferior a 2.0 %.

O desvio padrão da precisão intermédia é obtido a partir da **equação 22**:

$$Si = \sqrt{\frac{1}{2t} \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2} \quad (22)$$

Onde:

t- o número de amostras ensaiadas;

j- o número da amostra (que vai de 1 a t amostras);

y_{j1}- o primeiro resultado obtido para a amostra j;

y_{j2}- o segundo resultado obtido para a amostra j.

O limite de precisão intermédia (r_i) é obtido pela **equação 23**: [5, 57, 59]

$$r_i = \frac{Si * 2,8}{\bar{x}} * 100 \quad (23)$$

5.1.1.4. Estimativa da incerteza

Aos resultados finais das medições estão associadas incertezas que advêm de várias fontes. A incerteza tem sido, por vezes, confundida com o erro de um resultado, o que não é correto uma vez que a incerteza exprime a possibilidade de erro do resultado, enquanto que o erro é a medida da exatidão do resultado. A NP EN ISO/IEC 17025:2005 menciona que o laboratório deverá identificar todos os componentes da incerteza baseando-se em métodos de análise apropriados. Por definição, incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza medida e, quanto maior for a incerteza, menor será a confiabilidade do resultado. As várias fontes de incerteza são, por exemplo, amostragem, condições de armazenamento, efeitos instrumentais, pureza dos reagentes, estequiometria pressuposta, condições de medição efeitos da amostra, correções do branco, efeitos do operador, entre outros. [5]

A estimativa da incerteza é determinada tendo em conta a norma ISO 11352:2012, na qual é especificado um conjunto de procedimentos que permite aos laboratórios estimar a incerteza dos resultados utilizando uma abordagem que considera os dados de validação e controlo de qualidade dos métodos analíticos. A incerteza do método é, assim, definida mediante a conjugação de duas componentes, a componente aleatória (precisão) e a componente sistemática (exatidão), que podem ser estimadas por várias abordagens. Após a seleção da abordagem, as componentes podem ser estimadas e incluídas no cálculo da incerteza que é reportada como incerteza expandida do método.


Componente aleatória (precisão)

De forma a estimar as variações aleatórias (precisão) dos resultados das medições, estas devem ser efetuadas sob as mesmas condições que são utilizadas quando a análise de rotina é realizada. Segundo a norma ISO 11352:2012, para estimar a componente de incerteza da precisão (reprodutibilidade intralaboratorial – $U_{(Rw,relativo)}$) podem ser consideradas pelo menos duas abordagens: através de padrões de controlo ou através de duplicados de amostras.

No presente relatório a componente da precisão ($U(R_{w,relativo})$) foi apenas estimada a partir dos resultados obtidos na precisão intermédia ($R_{w,relativo}$) do método, ou seja, o $U(R_{w,relativo}) = R_{w,relativo}$. De forma a calcular o $R_{w,relativo}$, recorreu-se a diversos parâmetros como:

- R_w : é o desvio-padrão associado à precisão intermédia do método;
- \bar{x} : é a média associada aos resultados obtidos na precisão intermédia;
- n : é o número de resultados.

Tendo em conta os parâmetros acima descritos para cada norma ISO, determinou-se assim a componente da precisão com base na **equação 24**:

$$U(R_{w,relativo}) = R_{w,relativo} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (u(R_{w,relativo;i}))^2}{n_{R_w}}} = \frac{R_w}{\bar{x}} * 100 \quad (24)$$


Como já foi supracitado, dado que só se usou os dados obtidos da precisão intermédia do determinado método, a expressão pode ser simplificada.

Componente sistemática (exatidão)

A veracidade do método corresponde à componente da incerteza dos efeitos sistemáticos (exatidão). Esta componente pode ser estudada utilizando materiais de referência da matriz, ensaios interlaboratoriais, ensaios de recuperação, entre outras ferramentas de controlo de qualidade.

No presente relatório, a componente sistemática da incerteza ($U_{bias,relativo}$) foi estimada a partir de materiais de referência certificados. Os cálculos variam consoante se utiliza apenas um MRC ou mais do que um MRC, finalizando-se sempre no cálculo da incerteza expandida. De maneira a não tornar demasiado extensiva esta parte, os cálculos da incerteza associada a esta componente sistemática encontram-se no **anexo E**.

Incerteza padrão combinada

O cálculo deste tipo de incerteza consiste na combinação entre a incerteza padrão de precisão e a incerteza padrão de exatidão, caso não sejam consideradas outras fontes de incerteza. É expressa segundo a **equação 25**:

$$u_{relativo} = \sqrt{u_{(R_w,relativo)}^2 + u_{(bias)relativo}^2} \quad (25)$$

Onde $u_{R_w,relativo}$ corresponde à incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial e $u_{bias,relativo}$ à incerteza associada à componente sistemática.

Incerteza expandida

A incerteza expandida, U , corresponde à determinação global da incerteza, sendo expressa pela **equação 26**:

$$U_{relativo} = k * u_{relativo} \quad (26)$$

Onde o fator de cobertura, k , foi definido como sendo igual a 2 para um nível de confiança de 95%, e $u_{relativo}$ a incerteza padrão combinada. [63]

5.1.2. Avaliação direta

5.1.2.1. Exatidão

Segundo a ISO 3534, a exatidão de um método analítico traduz a concordância entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceite como verdadeiro. Quando é aplicada a um conjunto de dados, refere-se à combinação da veracidade/justeza (componentes de erros sistemáticos) com a precisão/fidelidade (componentes de erros aleatórios). A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada. Um método diz-se exato se o erro sistemático (módulo do erro absoluto) é inferior ao intervalo de confiança estimado.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em ensaios interlaboratoriais (EIL), ensaios de recuperação e testes comparativos. [5, 60]

5.1.2.1.1. Materiais de Referência Certificados (MRC)

Os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio, constituindo uma excelente ferramenta no Controlo Externo da Qualidade de uma análise química e permitindo avaliar o desempenho do laboratório. Possuem um valor de grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada, contudo em alguns casos, como nos MRC multi-componente, pode acontecer que nem todos os parâmetros tenham incerteza atribuída. O seu fornecimento é realizado por organismos reconhecidos e confiáveis, como por exemplo o NIST (*National Institute of Standards and Technology*), IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*), entre outros. A periodicidade da análise dos materiais de referência certificados deve ser estipulada em função da frequência de análises efetuadas no laboratório, de estas serem de rotina ou de carácter pontual, do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o resultado.

Para avaliar a exatidão utilizando um MRC, os valores obtidos da análise no laboratório devem ser comparados com os valores certificados do material de referência. No caso do valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado no certificado, o laboratório deve efetuar um plano de ações corretivas de forma a detetar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las. [5, 57, 64] A avaliação dos resultados obtidos na análise dos MRC pode ser feita através do cálculo de:

Erro relativo

Expressa-se como o quociente entre o erro absoluto (que é o módulo da diferença entre o entre o valor observado/obtido (X_{lab}) e o valor convencionalmente aceito como verdadeiro (X_v)) e valor de referência convencionalmente considerado como verdadeiro, em percentagem (%ER) (**equação 27**):

$$\%ER = \frac{|X_{lab} - X_v|}{X_v} * 100 \quad (27)$$

O erro relativo exprime a componente de erros sistemáticos e um valor inferior ou igual a 5% em alguns casos pode ser satisfatório sendo, no entanto, este valor meramente indicativo. Cabe ao laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo. [60]

Teste de hipótese (teste t)

Através deste teste é possível averiguar a existência de erros sistemáticos, aplicando a **equação 28**:

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) * \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}} \quad (28)$$

Onde:

N- O número de amostras analisadas;

$S_{X_{lab}}$ - O desvio padrão associado à média dos valores obtidos pelo Laboratório (X_{lab}).

O valor t é comparado com o valor crítico t_{tab} (tabelado para determinado grau de confiança e $N-1$ graus de liberdade), sendo o critério de aceitação:

$$\left\{ \begin{array}{l} |t| \leq t_{tab} \rightarrow \text{Ensaio satisfatório.} \\ |t| > t_{tab} \rightarrow \text{Ensaio não satisfatório. [5]} \end{array} \right.$$

Fator de desempenho (z-score)

O fator de desempenho do método (z-score) expressa-se como a variável reduzida em que S representa a unidade de desvio, podendo ser a incerteza associada ao material certificado (MRC) ou o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio inter-laboratorial (equação 29).

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (29)$$

Segundo a norma ISO 17043, a avaliação do z-score em valor absoluto conduz às seguintes conclusões:

$$\left\{ \begin{array}{l} |z| \leq 2 \rightarrow \text{Desempenho satisfatório} \\ 2 < |z| \leq 3 \rightarrow \text{Desempenho questionável} \\ |z| > 3 \rightarrow \text{Desempenho insatisfatório. [5, 60]} \end{array} \right.$$

Erro normalizado

O erro normalizado é estimado através da seguinte equação, onde U_{lab} corresponde à incerteza associada ao laboratório e U_{ref} à incerteza associado ao valor verdadeiro (equação 30).

$$En = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{Lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (30)$$

Quando o valor de erro normalizado em valor absoluto é menor ou igual a 1, então U_{lab} está bem estimada e o ensaio realizado é satisfatório. [5, 60]

5.1.2.1.2. Ensaio interlaboratoriais (EIL)

Segundo a norma ISO/IEC 17043, um ensaio interlaboratorial corresponde à organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo item (ou similares) por dois ou mais laboratórios respeitando condições pré-determinadas. Existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante os objetivos a que se destinam. Normalmente são regulados por organismos como o FAPAS (*Food Analysis Performance Assessment Scheme*). Eles são:

- Ensaio Interlaboratorial de Aptidão: que se destina a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, sendo em alguns países uma condição obrigatória para a creditação do laboratório. Deve, sempre que possível, estar rastreado a um MRC, podendo geralmente os participantes usar os métodos que entenderem;

- Ensaio Interlaboratorial de Normalização: que se destina a estudar a reprodutibilidade e repetibilidade de um método de análise. Neste caso, é condição de acesso a utilização exclusiva do método em causa;

- Ensaio Interlaboratorial Comparativo: onde é permitido a utilização de mais do que um método de ensaio, mas executados por um mesmo protocolo para comparação de resultados;

- Ensaio Interlaboratorial de Consenso ou Conformidade: que visa a determinação de propriedades de um ou mais materiais por vários laboratórios, que futuramente poderão ser utilizados em EIL ou para controlo de qualidade;

- Ensaio Interlaboratorial de Certificação: em que vários laboratórios realizam ensaios a um material candidato a MRC, por métodos adequados, de forma a estabelecer valores certificados e respetivas incertezas para as características do material ensaiado.

Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais em que participa devem ser objeto de uma análise cuidada, de que resulta um plano de ações corretivas de forma a manter ou melhorar o desempenho do laboratório. [5, 65]

5.1.2.1.3. Ensaios de recuperação

As perdas do analito a analisar ocorrem na maioria dos métodos analíticos, nomeadamente quando se realiza a sua extração de matrizes mais complexas. Consequentemente o valor resultante da medição poderá ser inferior à concentração exata presente na amostra original. Assim, a avaliação da quantidade de analito que pode ser adicionada à amostra, extraída e quantificada constitui um procedimento de validação importante. A cada amostra devem ser adicionadas diferentes concentrações de analito, de acordo com a sua concentração esperada, nomeadamente:

- Próxima da concentração máxima permitida de utilização;
- Próxima do LD;
- Próxima da concentração intermédia da gama de trabalho do método;
- Entre 50 a 150% da concentração esperada do analito, em amostras com maiores concentrações do analito.

A recuperação é calculada, em percentagem, através da **equação 31**:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_{\text{fortificada}} - C_{\text{matriz}})}{C_{\text{adicionada}}} * 100 \quad (31)$$

Onde:

$C_{\text{fortificada}}$ - concentração da amostra fortificada;

C_{matriz} - concentração da amostra não fortificada;

$C_{\text{adicionada}}$ - concentração adicionada de analito. [57, 66]

5.1.2.1.4. Testes comparativos

O objetivo principal deste tipo de ensaio comparativo é estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, de avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência. A comparação baseia-se na realização de ensaios em replicado, utilizando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras, considerando apenas uma gama restrita de concentrações ou em toda a gama em que se pretende validar o método. Para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, pode-se recorrer a:

- Teste de hipótese: teste t das médias;
- Teste de hipótese: teste t das diferenças (amostras emparelhadas);

- Teste da regressão linear entre os dois métodos. [5]

5.1.3. Análise estatística

5.1.3.1. Teste C de Cochran

O teste C de Cochran tem como objetivo principal a deteção de valores discrepantes, contudo também permite a avaliação da homogeneidade das variâncias, existindo outros métodos mais rigorosos para este último propósito. É um teste unilateral, pois verifica somente valores altos. O valor C de Cochran é calculado pela razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias das amostras (**equação 32**):

$$C = \frac{w_{\max}^2}{\sum_i^k w_i^2} \quad (32)$$

Onde:

w_{\max}^2 - Maior variância

$\sum_i^k w_i^2$ - Somatório de todas as variâncias.

O valor C obtido é comparado com o valor crítico tabelado para o teste de Cochran (C_{tabelado}) presente no **Anexo B**, sendo o valor rejeitado quando é superior ao valor crítico para o valor adequado de **k** matrizes e **n** ensaios. [56, 67]

5.1.3.2. Teste de Grubbs

O teste de Grubbs tem como objetivo detetar a presença de valores discrepantes, designados de *outliers*, nos resultados amostrais. Estes *outliers* são valores que apresentam um grande afastamento dos restantes ou são inconsistentes com estes, sendo as principais causas do aparecimento de outliers os erros de medição, os erros de execução e a variabilidade inerente dos elementos da população. Este teste baseia-se na diferença entre o *outlier* e o valor da média amostral, relacionando com o desvio padrão da amostra (**equação 33**):

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{\sigma} \quad (33)$$

Onde:

x_i - Valor discrepante (*outlier*)

\bar{x} - Média

σ - Desvio-padrão

O valor resultante desta equação (G) é comparado com o valor crítico tabelado (G_{tabelado}) para teste de Grubbs presente no **Anexo B**. Se o valor de G exceder o valor crítico, o valor discrepante é rejeitado, ou seja, trata-se de um *outlier*. [56, 67, 68]

6. Metodologia utilizada

Os métodos analíticos a validar no presente trabalho têm como principal objetivo a determinação de diversos parâmetros em diferentes matrizes lácteas. De seguida são apresentados os procedimentos das 4 normas ISO validadas.

6.1. ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar- Determinação da matéria gorda

6.1.1. Objetivo e princípio do método

Este procedimento tem como objetivo a determinação do conteúdo de matéria gorda em manteigas, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar. A matéria gorda é extraída da amostra em estudo pelo uso de um solvente específico. A fase solvente/matéria gorda é separada da fase aquosa e transferida quantitativamente para um balão de fundo plano. O solvente é removido por evaporação e a massa da matéria gorda é determinada. [69]

6.1.2. Campo de aplicação

Esta norma aplica-se a manteigas; emulsões de óleos edíveis que correspondem a produtos de elevado teor de matéria gorda (>75% de matéria gorda) com os mesmos constituintes que a manteiga, mas uma composição que não está definida no Codex para a manteiga; e gorduras para barrar como margarinas, gorduras de oleaginosas, gorduras lácteas e misturas destas.

6.1.3. Materiais e Equipamentos

No presente trabalho foi utilizado material de laboratório de uso corrente, e ainda:

- Balança analítica da marca Sartorius BP 221 S, com capacidade de pesagem máxima de 220g e d=0,1mg;
- Evaporador rotativo (Büchi Rotavapor R-200 e banho: Büchi Heating Bath B-490);
- Sonda de temperatura, da marca HANNA;
- Proveta de 50mL;
- Balões de fundo plano de 100mL;
- Pipetas volumétricas de 10mL;
- Centrífuga da marca Hettich Lab Technology, com uma velocidade máxima de 15000rpm;
- Vortéx;
- Tubos de centrifugação com capacidade de 50mL;
- Estufa da marca Binder a 102°C;

- Exsicador.

6.1.4. Reagentes

Apenas se utilizou reagentes de qualidade analítica reconhecida, salvo indicação em contrário, e água destilada, isenta de cloretos.

- Solvente de extração, sendo neste caso o éter de petróleo com um intervalo de ebulição dos 40°C aos 60°C;

Por cada série de trabalho foi preparado um branco, preparado usando todos os reagentes, mas omitindo a amostra.

6.1.5. Preparação da amostra

Tendo em conta o campo de aplicação, as amostras utilizadas nesta ISO encontram-se na **tabela 3**, sendo que os rótulos respetivos de algumas destas amostras se encontram no **anexo A**:

Tabela 3. Matrizes analisadas na validação da norma ISO 17189:2003.

Grupo	Matrizes a analisar
Leite, produtos lácteos e derivados	<p>Manteigas: com sal da marca é (continente); magra da marca Continente.</p> <p>Margarinas: Margarina da marca Vaqueiro; Margarina (Redução de colesterol) da marca Becel; Material de referência: FAPAS T14151 Mixed fat spread e FAPAS T14167 Mixed fat spread.</p>

A preparação das amostras baseou-se no procedimento interno PAFQ.044 relativo aos métodos de preparação de amostras para análise para os produtos lácteos. Segundo este procedimento, nas manteigas com teor de matéria gorda baixo (ou seja, a manteiga magra e margarina redução do colesterol) apenas se transferiu o seu conteúdo para uma gobelé de tamanho apropriado, homogeneizou-se com um utensílio próprio para o efeito e guardou-se num frasco para uso posterior. Para manteigas com teor de matéria gorda $\geq 70\%$ (como a manteiga com sal e margarina Vaqueiro), transferiu-se a amostra para um gobelé de tamanho adequado e tapou-se com parafilme. Mergulhou-se num banho de água a uma temperatura não superior a 35°C até se tornar mais fácil a homogeneização. Por fim homogeneizou-se e guardou-se num frasco para uso posterior. [70]

Para cada amostra foram realizados 8 ensaios no mesmo dia para a determinação da repetibilidade e, em 5 dias diferentes, duplicados para a determinação da precisão intermédia.

6.1.6. Procedimento

6.1.6.1. Preparação do balão para coletar gordura

Antes de se iniciar o procedimento para a determinação da matéria gorda nas matrizes em questão, tarou-se os balões de fundo plano de 100mL secando-os inicialmente na estufa a 102°C durante 30 minutos e de seguida deixou-se arrefecer no exsiccador. Anotaram-se as massas dos balões tarados.

6.1.6.2. Amostra

Tendo em conta que se optou por uma separação por centrifugação, pesou-se para os tubos de centrifugação 5g para as manteigas e emulsões de óleos edíveis e cerca 1,5g para as gorduras para barrar.

6.1.6.3. Determinação

Às amostras previamente pesadas adicionou-se 20mL do solvente de extração (éter de petróleo). Paralelamente ao tubo do branco apenas se adicionou os 20mL de solvente de extração. Com a ajuda do vortex, agitou-se vigorosamente os tubos de centrifugação e de seguida centrifugou-se a 720rpm durante 5 minutos.

Com a ajuda de pipetas, transferiu-se o máximo possível a fase do solvente para o respetivo balão de 100mL de fundo redondo. Procedeu-se a uma segunda e terceira extração, repetindo os passos anteriores mas com volumes de solvente diferentes. Estes volumes necessários de solvente de extração estão presentes na **tabela 4**:

Tabela 4. Número de extrações e volume do solvente de extração a ser usado para a separação por centrifugação para as diferentes matrizes

Amostra	Volume solvente de extração (mL)		
	Extração 1	Extração 2	Extração 3
Manteiga; Emulsões de óleos edíveis (>75% M.G.)	20	10	10
Gorduras para barrar (>10% e <90% M.G.)	20	20	20

Após as 3 extrações, evaporou-se o solvente recorrendo ao evaporador rotativo. Posteriormente colocou-se os balões de fundo plano, com a gordura, na estufa a 102°C durante 30min. Após ter decorrido este tempo, colocaram-se os mesmos no exsiccador para

arrefecer e pesou-se. Repetiu-se o processo de secagem na estufa e arrefecimento no exsiccador até a diferença de massas entre duas pesagens consecutivas não ter excedido os 1,0mg.

6.2. ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado- Determinação do conteúdo total de sólidos

6.2.1. Objetivo e princípio do método

O objetivo específico deste procedimento é a determinação do conteúdo total de sólidos do leite, natas e leite evaporado. Uma porção destas matrizes é seca num banho de água em ebulição e a água remanescente é evaporada na estufa a $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. [71]

6.2.2. Campo de aplicação

Este procedimento aplica-se a matrizes de leites, natas e leites evaporados.

6.2.3. Materiais e Equipamentos

Utilizou-se material de laboratório de uso corrente, nomeadamente:

- Balança analítica da marca Sartorius BP 221 S, com capacidade de pesagem máxima de 220g e $d=0,1\text{mg}$;
- Exsiccador;
- Banho de água, da marca Julabo SW22;
- Estufa, da marca Binder a 102°C ;
- Caixas de petri metálicas;
- Pipeta de 4mL.

6.2.4. Preparação das amostras

As amostras utilizadas nesta ISO encontram-se na **tabela 5**, estando os rótulos de algumas no **Anexo A**:

Tabela 5. Matrizes a analisar da norma ISO 6731:2010.

Grupo	Matrizes a analisar
Leite, produtos lácteos e derivados	<p>Leites: Material de referência designado por DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52); Leite UHT Magro da marca Pingo Doce; Leite Meio-Gordo da marca Masterchef.</p> <p>Leites evaporado: Material de referência designado por DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13).</p> <p>Natas: Material de referência designado por DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38); Natas magras da marca Paturáges.</p>

6.2.4.1. Leites

Devido à possibilidade de a matéria gorda estar aderente às paredes da embalagem, aqueceu-se a amostra (na própria embalagem) a uma temperatura entre 35°C e 40°C, agitando-se ocasionalmente. Por fim transferiu-se a amostra para um frasco, tendo o cuidado de não ficar resíduos na embalagem. No caso de isto acontecer, colocar novamente no banho de água quente. Homogeneizou-se o frasco para a análise posterior da amostra.

6.2.4.2. Leites evaporados

Inicialmente mergulhou-se a embalagem ainda fechada do leite evaporado num banho de água a 40°C durante 2 horas, agitando ocasionalmente. No final deste tempo, transferiu-se o conteúdo da embalagem para um recipiente apropriado e homogeneizou-se. Por fim guardou-se a amostra para uso posterior.

6.2.4.3. Natas

Primeiramente agitou-se a amostra no pacote com movimentos verticais. De seguida abriu-se a embalagem e homogeneizou-se o seu conteúdo e transferiu-se para um frasco para uso posterior. [70]

6.2.5. Procedimento

6.2.5.1. Preparação das caixas metálicas

Inicialmente tararam-se as caixas metálicas, colocando-as na estufa, com a sua tampa, durante 1 hora a 102°C. Após decorrido este tempo, colocaram-se as caixas metálicas no exsiccador para arrefecer à temperatura ambiente e pesaram-se, anotando-se as massas.

6.2.5.2. Amostra

Pesou-se cerca de 3g das amostras previamente tratadas para as caixas metálicas, tendo em conta no final de espalhar a amostra por toda a caixa. No caso do leite evaporado adicionou-se 4mL de água e de seguida espalhou-se a amostra por toda a caixa metálica.

6.2.5.3. Determinação

Colocou-se a caixa metálica, sem a tampa, num banho de água em ebulição durante 30 minutos. Passado este tempo, colocaram-se as caixas metálicas na estufa, com a tampa ao lado, durante 2 horas. De seguida colocaram-se as caixas no exsiccador, para arrefecerem à temperatura ambiente, e após arrefecimento anotou-se as suas massas. Executou-se um segundo aquecimento na estufa, durante apenas 1 hora e procedeu-se de seguida conforme o referido anteriormente. Estas operações foram repetidas até a diferença de massas entre duas pesagens consecutivas não exceder 1mg.

6.3. ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)

6.3.1. Objetivo e princípio do método

Esta norma estabelece um procedimento para a determinação do pH do soro nas matrizes de manteigas. Segundo esta norma, o pH do soro da manteiga corresponde à diferença de potencial na temperatura de medição entre dois elétrodos imersos no soro de manteiga, determinado pelo procedimento especificado de seguida. Esta diferença de potencial é medida entre um eletrodo de vidro e um eletrodo de referência no soro separado da manteiga derretida.

6.3.2. Campo de aplicação

O método é aplicável a todas as matrizes de manteiga.

6.3.3. Materiais e Equipamentos

No presente trabalho foi utilizado material de laboratório de uso corrente, e ainda:

- Balança analítica, marca Sartorius BP 221 S, com capacidade de pesagem máxima de 220g e d=0,1mg;
- Tubos de plástico com capacidade de 50mL;
- Tubos de plástico com capacidade de 10mL;
- Centrífuga da marca Hettich Lab Technology, com uma velocidade máxima de 15000rpm;

- Banho de água, da marca Julabo SW22;
- Medidor de pH GLP 21, da marca Crison, com termómetro incorporado.

6.3.4. Reagentes

Apenas se utilizou reagentes de qualidade analítica reconhecida, salvo especificação em contrário, e água recentemente destilada que tenha sido protegida da absorção de dióxido de carbono e que cumpra os requisitos para água de grau 1 especificados na ISO 3696: 1987.

6.3.4.1. Soluções-tampão

Para a calibração do medidor de pH utilizaram-se três soluções-tampão com valores de pH conhecidos até à segunda casa decimal à temperatura de medição, que fixaram o valor de pH do soro obtido a partir da amostra. As três soluções-tampão utilizadas foram:

Solução-tampão de pH 2,00 a 20°C

Solução-tampão de pH 4,00 a 20°C

Solução-tampão de pH 9,22 a 20°C

Por cada série de trabalho foi preparado um branco, preparado usando todos os reagentes, mas omitindo a amostra.

6.3.5. Preparação de amostra

Uma vez que este trabalho se baseia em matrizes de manteigas, as amostras utilizadas encontram-se na **tabela 6**, sendo que os rótulos respetivos de algumas destas amostras se encontram no **Anexo A**:

Tabela 6. Matrizes a analisar da norma ISO 7238:2004.

Grupo	Matrizes a analisar
Leite, produtos lácteos e derivados	Manteigas: com sal da marca é (continente) ; sem sal da marca Mimosa ; meio-sal da marca Continente ; magra da marca Continente ; com alho e salsa da marca Mimosa ; material de referência DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21).

A preparação das amostras baseou-se no procedimento interno PAFQ.044 relativo aos métodos de preparação de amostras para análise para os produtos lácteos, já referido anteriormente para o caso destas matrizes na norma ISO 17189. [70]

Para cada amostra foram realizados 8 ensaios no mesmo dia para a determinação da repetibilidade e, em 5 diferentes dias, duplicados para a determinação da precisão intermédia.

6.3.6. Procedimento

6.3.6.1. Amostra

Pesaram-se cerca de 50g de amostra diretamente para tubos de plástico.

6.3.6.2. Separação do soro

Colocaram-se os tubos de plástico contendo a amostra num banho de água quente a 65°C. Após a formação de duas camadas na manteiga derretida, centrifugou-se os tubos a 2000rpm durante 5 minutos. Imediatamente de seguida, colocaram-se os tubos no congelador até a matéria gorda congelar por completo. Por fim, separou-se o soro para tubos de plástico com uma capacidade inferior, apropriados para a análise com o medidor de pH, e colocou-se à temperatura de 20°C.

6.3.6.3. Calibração do medido de pH

Com as soluções-tampão à temperatura de medição (20°C), calibrou-se o medidor de pH de acordo com as instruções do aparelho.

6.3.6.4. Determinação

Após os tubos contendo o soro terem atingido a temperatura de medição, introduziu-se os elétrodos no soro. Determinou-se o pH usando o procedimento apropriado ao medidor de pH utilizado. A leitura foi feita em duplicado para cada tubo.

Uma nota a considerar é em relação à limpeza dos elétrodos, utilizando-se água destilada à temperatura ambiente e um papel seco entre as medições dos tubos e no final com acetona à temperatura ambiente e água a 30°C.

6.4. ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos (Método de referência)

6.4.1. Objetivo e princípio do método

Esta norma estabelece um procedimento para a determinação do conteúdo total de sólidos em queijos e queijos processados. Uma porção de teste, previamente pesada, misturada com areia é seca por aquecimento em estufa a 102°C. A porção de teste seca é depois pesada para determinar a perda de massa.

6.4.2. Campo de aplicação

O seguinte método é aplicável a queijos e queijos processados.

6.4.3. Materiais e Equipamentos

No presente trabalho foi utilizado material de laboratório de uso corrente, e ainda:

- Balança analítica, marca Sartorius BP 221 S, com capacidade de pesagem máxima de 220g e d=0,1mg;
- Caixas de petri metálicas;
- Varetas de vidro;
- Exsicador;
- Estufa, da marca Binder a 102°C;

6.4.4. Reagentes

Apenas se utilizou reagentes de qualidade analítica reconhecida e água destilada ou desmineralizada ou água com um nível de pureza equivalente.

- Areia. Considerações sobre este reagente:
 - o A areia teve de passar através de um peneiro de tecido metálico com um tamanho nominal de abertura de 600µm e de ser retida por um peneiro com um tamanho nominal de abertura de 150µm.
 - o A areia cumpriu o seguinte ensaio de aptidão: colocou-se 20g de areia na caixa de petri metálica com a vareta associada. Foi levada à estufa a 102°C durante, pelo menos, 2horas. Após decorrido este tempo, colocou-se a caixa no exsicador para arrefecer à temperatura ambiente, pesando-se quando atingisse esta temperatura e registando-se a massa. Adicionou-se à caixa de petri 5mL de água, homogeneizando-se e levando-se novamente à estufa a 102°C durante, pelo menos, 4horas. Decorrido este tempo, deixou-se arrefecer no exsicador à temperatura ambiente e por fim pesou-se, anotando a massa. A diferença entre estas duas não deve exceder os 1,0mg.

Por cada série de trabalho foi preparado um branco, preparado usando a areia mas omitindo a amostra.

6.4.5. Preparação da amostra

Uma vez que este trabalho se baseia queijos e queijos processados, as amostras utilizadas encontram-se na **tabela 7**:

Tabela 7. Matrizes a analisar da norma ISO 5534:2004.

Grupo	Matrizes a analisar
Leite, produtos lácteos e derivados	Queijos: Material de referência DRRR Processed cheese (M CP L SK 13) e DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8); Queijo da ilha; Queijo flamengo; Queijo magro.

A preparação das amostras baseou-se no procedimento interno PAFQ.044 relativo aos métodos de preparação de amostras para análise para os produtos lácteos. Segundo este procedimento, no queijo processado apenas se homogeneizou o seu conteúdo e transferiu-se para um frasco para uso posterior. O queijo meio-duro sofreu a homogeneização no moinho granulador, transferindo-se no final para um frasco para uso posterior. [70]

Para cada amostra foram realizados 8 ensaios no mesmo dia para a determinação da repetibilidade e, em 5 diferentes dias, duplicados para a determinação da precisão intermédia.

6.4.6. Procedimento

Branco

Simultaneamente à determinação do conteúdo total de sólidos nas amostras, executou-se um teste em branco usando o mesmo procedimento que se segue da preparação das caixas metálicas e determinação, mas omitindo a amostra.

Preparação das caixas metálicas

Inicialmente levou-se as caixas metálicas, contendo aproximadamente 20g de areia, com a vareta e a tampa associada à estufa a 102°C durante 1 hora. Decorrido este tempo, colocou-se as caixas metálicas no exsiccador para arrefecer à temperatura ambiente. Após arrefecer, pesou-se as caixas metálicas com a vareta e a tampa, anotando o valor com 4 casas decimais.

Determinação

Pesaram-se cerca de 3,0g de amostra para as caixas metálicas, misturando a amostra com a areia com a ajuda da vareta e espalhou-se a amostra pela caixa metálica. Colocou-se a caixa com a vareta, e a tampa ao lado, na estufa a 102°C durante 3 horas. Após este tempo, colocaram-se as caixas no exsiccador e, após ter arrefecido à temperatura ambiente, pesou-se com 4 casas decimais. As caixas metálicas foram novamente à estufa a 102°C, durante apenas 1 hora, sendo arrefecidas no exsiccador à temperatura ambiente e pesadas após terem arrefecido. Este procedimento repetiu-se até a massa das caixas metálicas diminuir por 2,0mg ou menos ou aumentar entre duas pesagens consecutivas.

7. Resultados e discussão

O desenvolvimento de um método analítico implica a realização de vários estudos com vista à sua validação e posterior implementação em rotina. Assim, ao longo do estágio na *Silliker*, procurou-se validar 4 normas ISO referentes à determinação de diversos parâmetros em diferentes matrizes lácteas pretendendo demonstrar que os procedimentos analíticos referentes a estas normas são adequados à finalidade pretendida. Para validar estes métodos foram então realizados os ensaios necessários para avaliar cada um dos seguintes critérios, para cada uma das seguintes normas ISO.

7.1. ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar- Determinação da matéria gorda

7.1.1. Matrizes

Como já referido anteriormente, para a validação deste método foram utilizadas as matrizes:

- ✓ FAPAS T14151 Mixed fat spread.
- ✓ FAPAS T14167 Mixed fat spread.
- ✓ Margarina.
- ✓ Margarina (redução de colesterol).
- ✓ Manteiga com sal.
- ✓ Manteiga magra.

7.1.2. Precisão

Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade, foram efetuados 8 ensaios sobre as matrizes referidas no ponto anterior nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e intervalos de tempo). Os dados obtidos dos 8 ensaios encontram-se no **Anexo C**. Os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 8** onde estão apresentados os parâmetros: média, variância (equação 13), desvio padrão de repetibilidade, coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) (equação 15) e limite de repetibilidade (equação 14) associados aos valores obtidos.

Tabela 8. Estudo da repetibilidade para a determinação da matéria gorda, referente à norma ISO 17189.

Amostra	Média	Variância	Desvio Padrão	CVr %	Limite de repetibilidade (Δr) (g/100g)
FAPAS T14151 Mixed fat spread	59,20	0,122	0,350	0,591	0,980
FAPAS T14167 Mixed fat spread	58,14	0,078	0,279	0,480	0,782
Margarina	57,74	0,393	0,627	1,085	1,755
Margarina (redução de colesterol)	42,69	0,154	0,393	0,921	1,100
Manteiga com sal	62,42	0,371	0,609	0,976	1,706
Manteiga magra	38,59	0,071	0,266	0,688	0,744

Os limites de repetibilidade calculados para as matrizes variam entre os valores 0,744 e 1,755 g/100g e os coeficientes de variação de repetibilidade variam entre os 0,480 e os 1,085%. O método apresenta uma boa repetibilidade para a análise da matéria gorda uma vez que o CVr é suficientemente baixo (<10%).

Recorreu-se ao Teste C de Cochran para comparar a homogeneidade das variâncias das matrizes e ao Teste de Grubbs para detetar a presença de valores “anormais” nos resultados amostrais. As tabelas relativas a estes testes estatísticos estão apresentadas no **Anexo B**. Os resultados para o Teste C de Cochran encontram-se na **tabela 9** e para o Teste de Grubbs na **tabela 10**:

Tabela 9. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 17189.

	Número de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor crítico tabelado- Cc (5%)	Avaliação
Teste C de Cochran	6	0,3928	0,3302	0,3980	Aceitável

Uma vez que o valor obtido de C de Cochran calculado para todas as matrizes é inferior ao valor de C tabelado (a 5%), não foi rejeitada nenhuma matriz.

Tabela 10. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 17189.

Amostra	População	Valor Crítico 1%	Valor mínimo	G Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G Valor máximo	Teste ao valor máximo
FAPAS T14151 Mixed fat spread	6	2,274	57,83	1,094	Aceitável	58,64	1,777	Aceitável
FAPAS T14167 Mixed fat spread	6	2,274	58,62	1,643	Aceitável	59,56	1,043	Aceitável
Margarina	6	2,274	57,05	1,091	Aceitável	58,64	1,444	Aceitável
Margarina (redução de colesterol)	6	2,274	42,16	1,347	Aceitável	43,28	1,505	Aceitável
Manteiga com sal	6	2,274	61,49	1,512	Aceitável	63,11	1,142	Aceitável
Manteiga magra	6	2,274	38,11	1,803	Aceitável	38,89	1,123	Aceitável

Segundo o teste de Grubbs, não existe nenhum valor discrepante, para um nível de confiança de 95%.

Em conclusão, para a ISO 17189 o limite de repetibilidade calculado foi de 1,178g/100g e o coeficiente de variação da repetibilidade foi de 2,213%.

Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia foram analisadas 5 medições em duplicado de todas as matrizes, expeto as matrizes de referência FAPAS T14151 Mixed fat spread e FAPAS T14167 Mixed fat spread, (população de 20 ensaios no total) para a determinação da matéria gorda. Os dados obtidos para cada uma das matrizes estudadas encontram-se no **Anexo D**. Os resultados obtidos para avaliar a precisão intermédia para cada uma das matrizes estão apresentados nas **tabelas 11 a 14**, onde se encontram os valores do desvio padrão da precisão intermédia (S_i) (equação 22), o limite da precisão intermédia (equação 23), o coeficiente de variação da precisão intermédia e no final de cada tabela um pequeno resumo dos resultados importantes obtidos em cada matriz.

Tabela 11. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz margarina.

Matéria gorda (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
09.12.2016	Margarina	57,77	58,33	-0,563	0,317	58,06
04.01.2017		57,26	57,95	-0,690	0,477	57,60
09.01.2017		58,52	57,67	0,846	0,716	58,10
13.01.2017		57,59	58,59	-1,001	1,002	58,09
19.01.2017		57,74	57,68	0,058	0,003	57,71
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,502
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,024
CV (%)						1%

O limite de precisão intermédia para a matriz margarina foi de 0,024 g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 1%.

Tabela 12. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz margarina (redução do colesterol).

Matéria gorda (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
22.11.2016	Margarina (redução do colesterol)	42,84	42,79	0,044	0,002	42,81
02.12.2016		43,03	43,28	-0,255	0,065	43,16
09.01.2017		43,65	43,32	0,327	0,107	43,48
13.01.2017		42,78	42,56	0,226	0,051	42,67
19.01.2017		42,77	42,73	0,041	0,002	42,75
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,150
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,010
CV (%)						0,4%

O limite de precisão intermédia para a matriz margarina (redução do colesterol) foi de 0,010 g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,4%.

Tabela 13. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz manteiga com sal.

Matéria gorda (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
14.11.2016	Manteiga com sal	61,66	62,10	-0,440	0,194	61,88
17.11.2016		61,75	62,85	-1,106	1,223	62,30
22.11.2016		61,91	61,87	0,043	0,002	61,89
02.12.2016		62,64	61,54	1,104	1,219	62,09
09.12.2016		61,87	62,57	-0,701	0,491	62,22
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,559
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,025
CV (%)						1%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga com sal foi de 0,025 g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 1%.

Tabela 14. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 17189, para a matriz manteiga magra.

Matéria gorda (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
14.11.2016	Manteiga magra	38,74	38,86	-0,108	0,012	38,80
17.11.2016		38,46	38,65	-0,184	0,034	38,55
24.11.2016		39,02	38,45	0,568	0,322	38,73
2.12.2016		38,71	37,58	1,123	1,261	38,15
9.01.2017		38,84	37,88	0,962	0,925	38,36
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,505
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,037
CV (%)						1%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga magra foi de 0,037 g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 1%.

No geral, o método apresenta uma boa precisão intermédia para a determinação de matéria gorda nas matrizes de manteigas, emulsões de óleo e gorduras comestíveis uma

vez que o CV da precisão intermédia é suficientemente baixo (<10%). Na **tabela 15** estão apresentados os cálculos da população no geral, ou seja, tendo em conta todos os valores de todas as matrizes.

Tabela 15. Resultados gerais do estudo da repetibilidade para a ISO 17189.

População:	20
Desvio padrão da precisão intermédia (Si):	0,459
Limite de precisão intermédia (g/100g):	0,026
Coeficiente de variação de precisão intermédia:	1%

Em conclusão, para a ISO 17189 o limite de precisão intermédia do método foi de 0,026g/100g e o coeficiente de variação foi de 1%.

7.1.3. Exatidão

Tal como referido anteriormente, a exatidão foi demonstrada com base nos resultados obtidos através dos materiais de referência FAPAS T14151 Mixed fat spread e FAPAS T14167 Mixed fat spread e através de resultados obtidos por ensaios de comparação interlaboratorial a partir da matriz T14168 Mixed fat spread. Os dados obtidos para a determinação da exatidão através dos materiais de referência encontram-se na **tabela 16** e os resultados obtidos pelo ensaio interlaboratorial encontram-se na **tabela 17**. Os certificados destes dois materiais de referência encontram-se no **anexo F**.

Tabela 16. Resultados obtidos nas matrizes analisadas pela norma ISO 17189.

Matriz	Valor medido (g/100 g)	Valor certificado (g/100 g)	Limite inferior (g/100 g)	Limite superior (g/100 g)	Avaliação da exatidão
FAPAS T14151 Mixed fat spread	59,47	59,51	57,98	61,05	OK
FAPAS T14167 Mixed fat spread	58,14	57,97	56,45	59,49	OK

Tabela 17. Resultado obtido no ensaio de comparação interlaboratorial.

Data	Circuito	Matriz	X _{lab}	X _{ref}	nº lab. participantes	Desvio (s _R)	"bias"	Avaliação
2016-12	FAPAS	T14168 Mixed fat spread	58,26	57,97	38	0,761	0,005	Aceitável

O valor obtido para a matriz FAPAS T14151 Mixed fat spread e para a matriz FAPAS T14167 Mixed fat spread foi de 59,47 g/100g e 58,14 g/100g, respetivamente. Estes valores encontram-se dentro dos limites estabelecidos, demonstrando assim que este método, em relação à exatidão, cumpre com os critérios estabelecidos para a matrizes analisadas. Pelo ensaio de comparação interlaboratorial utilizando a matriz T14168 Mixed fat spread, também se conclui que o ensaio foi aceite, indicando que o laboratório tem uma boa exatidão.

Com estes dados é possível avaliar o desempenho obtido pelo laboratório, através do cálculo do fator de desempenho (Z-score). Relativamente à matriz FAPAS T14151, aplicando a equação 26 e sabendo que o desvio (S_R) é 0,77, calcula-se o Z em módulo que é de 0,05 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório). Na matriz FAPAS T14167, o desvio é 0,76 e o Z em módulo é 0,22 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório).

7.1.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação pode ser determinado de diferentes formas como já referido anteriormente. Por esta norma ISO, o teor de matéria gorda foi calculado a partir da seguinte **equação 34**:

$$\text{Conteúdo de matéria gorda (\%)} = \frac{(m1 - m2) - (m3 - m4)}{m0} * 100 \quad (34)$$

Onde:

- m0 é a massa da amostra, em gramas;
- m1 é a massa do balão de fundo plano com a gordura coletada, em gramas;
- m2 é a massa do balão de fundo plano tarado;
- m3 é a massa do balão de fundo plano usado no ensaio do branco, em gramas;
- m4 é a massa do balão de fundo plano tarado usado no ensaio do branco, em gramas.

Neste caso não se utilizou a expressão para calcular o limite de quantificação uma vez que se obtinha um valor muito baixo, o que tornava impossível a verificação experimental. Assim, determinou-se que o limite de quantificação é de 5,00 g/100 g.

7.1.5. Gama de trabalho

A gama de trabalho foi considerada desde o valor do limite de quantificação até 5-10% do valor mais alto obtido para a repetibilidade das matrizes analisadas. Assim, a gama de trabalho deste método para a determinação da matéria gorda em matrizes de manteigas, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar foi de 5,00 g/100 g a 70,00 g/100 g.

7.1.6. Incerteza

Tal como já foi referido, a determinação da incerteza foi realizada com base na norma ISO 11352:2012, recorrendo-se a materiais de referência certificados e segundo as equações apresentadas no **anexo D**.

Nesta norma ISO, foram utilizados os materiais de referência certificados: FAPAS T14151 Mixed fat spread e FAPAS T14167 Mixed fat spread. Os resultados encontram-se na **tabela 18**.

Tabela 18. Avaliação da incerteza do método relativo aos dois MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_{w,relativo})$, incerteza associada à componente sistemática $U_{bias,relativo}$, incerteza padrão combinada $U_{relativo}$ e incerteza expandida $U_{relativo}$.

Materiais de Referência Certificados	
$U(R_{w,relativo})$	0,911
$U_{bias,relativo}$	0,366
$U_{relativo}$	0,982
$U_{relativo}$	1,964

Como é possível observar na **tabela 18**, a incerteza expandida associada à ISO 17189 para a determinação de matéria gordas em manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras de barrar é de 1,96%.

7.2. ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado - Determinação do conteúdo total de sólidos

7.2.1. Matrizes

Para a validação deste método foram utilizadas as seguintes matrizes:

- ✓ DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13).
- ✓ DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38).
- ✓ DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52).
- ✓ Leite magro.
- ✓ Leite meio gordo.
- ✓ Natas magras.

7.2.2. Precisão

Com o objetivo de avaliar a precisão, recorreu-se ao cálculo da repetibilidade e da precisão intermédia.

Repetibilidade

De maneira a avaliar a repetibilidade, foram efetuados 8 ensaios sobre as matrizes referidas nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e intervalos de tempo). Os dados obtidos dos 8 ensaios encontram-se no **Anexo C**. Os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 19** onde se encontram os parâmetros: média, variância (equação 13), desvio padrão de repetibilidade, coeficiente de variação de repetibilidade (CVr) (equação 15) e limite de repetibilidade (equação 14) associados aos valores obtidos.

Tabela 19. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo total de sólidos, referente à norma ISO 6731.

Amostra	Média	Variância	Desvio Padrão	CVr %	Limite de repetibilidade (Δr) (g/100g)
DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52)	12,24	0,007	0,086	0,703	0,241
DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13)	25,45	0,007	0,082	0,323	0,230
DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38)	42,21	0,007	0,086	0,203	0,240
Leite magro	9,341	0,0002	0,014	0,150	0,039
Leite meio gordo	11,65	0,001	0,035	0,297	0,097
Natas magras	26,00	0,002	0,042	0,161	0,117

Os limites de repetibilidade calculados para as matrizes variam entre os valores 0,039 e 0,241 g/100g e os coeficientes de variação de repetibilidade variam entre os 0,150 e os 0,703%. Uma vez que o CVr é suficientemente baixo (<10%) para todas as matrizes analisadas, conclui-se que o método apresenta uma boa repetibilidade.

Tal como efetuado anteriormente, realizou-se o Teste C de Cochran para comparar a homogeneidade das variâncias das matrizes (**tabela 20**) e o Teste de Grubbs para detetar a presença de valores “anormais” nos resultados amostrais (**tabela 21**). As tabelas relativas a estes testes estatísticos estão apresentadas no **Anexo B**.

Tabela 20. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 6731.

	Número de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor crítico tabelado- Cc (5%)	Avaliação
Teste C de Cochran	6	0,0070	0,3012	0,3980	Aceitável

Com base na **tabela 20**, não foi necessário rejeitar nenhuma matriz uma vez que após o cálculo do teste C de Cochran, o C calculado mostrou-se inferior ao C tabelado a 5%.

Tabela 21. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 6731.

Amostra	População	Valor Crítico 1%	Valor mínimo	G Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G Valor máximo	Teste ao valor máximo
DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52)	6	2,274	12,13	1,321	Aceitável	12,35	1,263	Aceitável
DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13)	6	2,274	25,33	1,350	Aceitável	25,56	1,389	Aceitável
DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38)	6	2,274	42,12	1,090	Aceitável	42,34	1,559	Aceitável
Leite magro	6	2,274	9,33	1,118	Aceitável	9,37	2,048	Aceitável
Leite meio gordo	6	2,274	11,61	1,305	Aceitável	11,70	1,339	Aceitável
Natas magras	6	2,274	25,95	1,189	Aceitável	26,08	1,991	Aceitável

Verifica-se que, segundo o teste de Grubbs, não existem nenhum discrepante, para um nível de confiança de 95%,

Em conclusão, para a ISO 6731 o limite de repetibilidade calculado foi de 0,161g/100g. O limite de repetibilidade relativo foi de 0,857%.

Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia foram analisadas 5 medições em duplicado das 6 matrizes, exceto para a matriz DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38) que só foram realizados 3 ensaios, para a determinação do conteúdo total de sólidos (população total de 28 ensaios). Os dados obtidos para cada uma das matrizes estudadas encontram-se no **Anexo D**. Os resultados obtidos para avaliar a precisão intermédia para cada uma das matrizes estão apresentados nas **tabelas 22 a 27**, onde se encontram os valores do desvio padrão da precisão intermédia (S_i) (equação 22), o limite da precisão intermédia (equação 23), o coeficiente de variação da precisão intermédia e no final de cada tabela um pequeno resumo dos resultados importantes obtidos em cada matriz.

Tabela 22. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR UHT Milk 3,5% fat (RM CP L M 52).

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média dos Ensaios
25.11.2016	DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52)	12,36	12,42	-0,065	0,004	12,39
06.12.2016		12,29	12,43	-0,136	0,019	12,36
15.12.2016		12,41	12,24	0,168	0,028	12,33
11.01.2017		12,23	12,36	-0,137	0,019	12,30
20.01.2017		12,50	12,35	0,149	0,022	12,43
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,096
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,022
CV (%)						0,8%

O limite de precisão intermédia para a matriz DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52) foi de 0,022g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,8%

Tabela 23. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13).

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média dos Ensaios
06.12.2016	DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13)	25,21	25,21	-0,001	0,000	25,21
15.12.2016		25,59	25,63	-0,043	0,002	25,61
11.01.2017		25,74	25,71	0,024	0,0006	25,72
20.01.2017		25,23	25,25	-0,021	0,0004	25,24
23.01.2018		25,38	25,35	0,022	0,0005	25,37
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,018
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,002
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13) foi de 0,002g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

Tabela 24. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38).

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média dos Ensaios
20.01.2017	DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38)	42,37	42,30	0,076	0,006	42,34
23.01.2017		42,04	42,38	-0,343	0,117	42,21
24.01.2017		42,26	42,23	0,029	0,0008	42,24
População						3
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,144
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,010
CV (%)						0,3%

O limite de precisão intermédia para a matriz DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38) foi de 0,010 g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,3%.

Tabela 25. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Leite Magro.

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média dos Ensaios
01.02.2017	Leite Magro	9,368	9,315	0,052	0,003	9,341
02.02.2017		9,913	9,955	-0,043	0,002	9,934
07.02.2017		9,182	9,188	-0,006	0,0000	9,185
09.02.2017		9,225	9,249	-0,024	0,0006	9,237
10.02.2017		9,256	9,228	0,027	0,0007	9,242
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,024
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,007
CV (%)						0,26%

O limite de precisão intermédia para a matriz leite magro foi de 0,007g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,26%.

Tabela 26. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Leite Meio Gordo.

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B)²	Média dos Ensaios
01.02.2017	Leite Meio Gordo	10,14	10,08	0,057	0,003	10,11
02.02.2017		11,69	11,65	0,036	0,001	11,67
09.02.2017		10,04	10,03	0,006	0,0000	10,04
10.02.2017		10,04	10,01	0,033	0,001	10,03
14.02.2017		10,03	10,14	-0,115	0,013	10,08
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,043
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,012
CV (%)						0,4%

O limite de precisão intermédia para a matriz leite meio gordo foi de 0,012g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,4%.

Tabela 27. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 6731, para a matriz Natas Magras.

Conteúdo total de sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média dos Ensaios
02.02.2017	Natas Magras	25,99	25,95	0,046	0,002	25,97
07.02.2017		25,99	25,96	0,031	0,001	25,97
09.02.2017		26,09	26,097	-0,004	0,0000	26,09
10.02.2017		26,039	26,06	-0,026	0,0007	26,05
14.02.2017		26,07	26,01	0,058	0,003	26,04
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,027
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,003
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz natas magras foi de 0,003g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

Tendo em conta os valores do CV da precisão intermédia, o método apresenta uma boa precisão intermédia uma vez que este valor é suficientemente baixo (<10%). Na **tabela 28** estão apresentados os cálculos da população no geral, ou seja, tendo em conta todos os valores de todas as matrizes.

Tabela 28. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 6731.

População:	28
Desvio padrão da precisão intermédia (Si):	0,067
Limite de precisão intermédia (g/100g):	0,100
Coeficiente de variação de precisão intermédia:	0,3%

Em conclusão, o limite de precisão intermédia do método foi 0,010g/100g e o coeficiente de variação foi 0,3%.

7.2.3. Exatidão

A exatidão foi demonstrada através dos resultados obtidos a partir dos materiais de referência: DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13), DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38) e DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52) (**tabela 29**) e a partir de resultados obtidos em ensaios de comparação interlaboratorial, tendo sido utilizada uma matriz de

leite pasteurizado (**tabela 30**). Os certificados destes três materiais de referência encontram-se no **anexo F**.

Tabela 29. Resultados obtidos nas matrizes analisadas pela ISO 6731.

Matriz	Valor medido (g/100 g)	Valor certificado (g/100 g)	Limite inferior (g/100 g)	Limite superior (g/100 g)	Avaliação da exatidão
DRRR Evaporated milk	25,44	25,47	25,21	25,73	OK
DRRR Raw cream	42,21	42,13	41,85	42,41	OK
DRRR UHT Milk	12,24	12,29	12,08	12,49	OK

Tabela 30. – Resultado obtido no ensaio de comparação interlaboratorial.

Data	Circuito	Matriz	X _{lab}	X _{ref}	nº lab. participantes	Desvio (S _R)	"bias"	Avaliação
2016-10	Silliker	Pasteurised milk	12,76	12,56	6	0,50	0,016	Aceitável

Segundo a **tabela 29**, os valores medidos para as matrizes estudadas tomaram valores entre os 12,24 e os 42,21 g/100g. Assim, comparando com os valores de referência, pode dizer-se que todas as matrizes estudadas apresentam boa exatidão visto que os valores obtidos se encontram dentro dos limites estabelecidos pela entidade de referência. A boa exatidão é novamente demonstrada no ensaio de comparação interlaboratorial, tendo o resultado sido aceite.

Com estes dados é possível avaliar o desempenho obtido pelo laboratório, através do cálculo do fator de desempenho (Z-score). Na matriz DRRR Evaporated milk, aplicando a equação 26 e sabendo que o desvio (S_R) é 0,13, calcula-se o Z em módulo que é de 0,23 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório). Na matriz DRRR Raw cream, o desvio é 0,14 e o Z em módulo é 0,57 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório). Na matriz DRRR UHT Milk, o desvio é 0,10 e o Z em módulo é 0,50 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório).

7.2.4. Limite de Quantificação

Neste método, a gama de trabalho foi calculada a partir da **equação 35** para a determinação do conteúdo total de sólidos:

$$\text{Conteúdo total de sólidos (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} * 100 \quad (35)$$

Onde:

- m_0 é a massa, em gramas, da caixa metálica com a tampa;
- m_1 é a massa, em gramas, da amostra;
- m_2 é a massa, em gramas, da caixa metálica com tampa e a amostra seca.

Tendo em conta que o valor máximo para $(m_2 - m_0)$ é de 0,001g e o valor máximo para a massa pesada de amostra é de 5g, calculou-se o limite de quantificação que é de 0,02 g/100 g.

7.2.5. Gama de trabalho

Tal como efetuado anteriormente, a gama de trabalho foi considerada desde o valor do limite de quantificação até 5-10% do valor mais alto obtido para a repetibilidade das matrizes analisadas. Assim, a gama de trabalho deste método para a determinação do conteúdo total de sólidos em leites, natas e leites evaporados foi de 0,02 g/100 g a 50,0 g/100 g.

7.2.6. Incerteza

A determinação da incerteza foi realizada com base na norma ISO 11352:2012, recorrendo-se a materiais de referência certificados e segundo as equações apresentadas no **anexo D**.

Nesta norma ISO, foram utilizados os materiais de referência certificados: DRRR Evaporated milk 8% fat (RM CP L KM 13), DRRR Raw cream (K7) (RM CP L R 38) e DRRR UHT Milk 3,5 % fat (RM CP L M 52). Os resultados encontram-se na **tabela 31**.

Tabela 31. Avaliação da incerteza do método relativo aos três MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_{w,relativo})$, incerteza associada à componente sistemática $u_{bias,relativo}$, incerteza padrão combinada $u_{relativo}$ e incerteza expandida, $U_{relativo}$.

Materiais de Referência Certificados	
$U(R_{w,relativo})$	0,344
$u_{bias,relativo}$	0,475
$u_{relativo}$	0,586
$U_{relativo}$	1,173

Como é possível observar na **tabela 31**, a incerteza expandida associada à ISO 6731 para a determinação do conteúdo total de sólidos em leite, natas e leite evaporado é de 1,17%.

7.3. ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)

7.3.1. Matrizes

As matrizes analisadas nesta norma ISO foram:

- ✓ Manteiga com sal.
- ✓ Manteiga sem sal.
- ✓ Manteiga magra.
- ✓ Manteiga meio sal.
- ✓ Manteiga com alho e salsa.
- ✓ DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21).

7.3.2. Precisão

A validação de um método de ensaio pode ser comprovada a partir destes seguintes parâmetros:

Repetibilidade

Foram efetuados 8 ensaios sobre as matrizes referidas no ponto anterior nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e intervalos de tempo). Os dados obtidos dos 8 ensaios encontram-se no **Anexo C**. Os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 32** onde estão apresentados os parâmetros: média, variância, desvio padrão de repetibilidade, coeficiente de variação de repetibilidade (Cvr) e limite de repetibilidade associados aos valores obtidos.

Tabela 32. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo de sal, referente à norma ISO 7238.

Amostra	Média	Variância	Desvio Padrão	Cvr %	Limite de repetibilidade (Δr)
Manteiga com sal	4,58	0,0002	0,014	0,303	0,039
Manteiga sem sal	5,66	0,0001	0,012	0,211	0,033
Manteiga meio sal	4,77	0,0002	0,013	0,269	0,036
Manteiga magra	5,36	0,0002	0,013	0,239	0,036
Manteiga com alho e salsa	6,30	0,0001	0,012	0,194	0,034
DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21)	5,68	0,0001	0,010	0,176	0,028

Os limites de repetibilidade calculados para as matrizes variam entre os valores 0,028 e 0,039 e os coeficientes de variação de repetibilidade variam entre os 0,176 e os 0,303%.

O método apresenta uma boa repetibilidade para a análise do pH do soro em manteigas uma vez que o CVr é suficientemente baixo (<10%).

Para se comparar a homogeneidade das variâncias das matrizes, recorreu-se ao Teste C de Cochran (**tabela 33**) e para detetar a presença de valores “anormais” nos resultados amostrais recorreu-se ao Teste de Grubbs (**tabela 34**). As tabelas relativas a estes testes estatísticos estão apresentadas no **Anexo B**, estando os resultados para estes dois testes nas seguintes tabelas:

Tabela 33. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 7238.

	Número de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor crítico tabelado- Cc (5%)	Avaliação
Teste C de Cochran	6	0,00026	0,2114	0,3980	Aceitável

Uma vez que o valor obtido de C de Cochran calculado para todas as matrizes é inferior ao valor de C tabelado (a 5%), não foi rejeitada nenhuma matriz.

Tabela 34. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 7238.

Amostra	População	Valor Crítico 1%	Valor mínimo	G Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G Valor máximo	Teste ao valor máximo
Manteiga com sal	6	2,274	4,565	1,216	Aceitável	4,600	1,307	Aceitável
Manteiga sem sal	6	2,274	5,650	1,099	Aceitável	5,680	1,414	Aceitável
Manteiga meio sal	6	2,274	4,755	1,170	Aceitável	4,790	1,560	Aceitável
Manteiga magra	6	2,274	5,345	1,025	Aceitável	5,375	1,318	Aceitável
Manteiga com alho e salsa	6	2,274	6,280	1,379	Aceitável	6,320	1,891	Aceitável
DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21)	6	2,274	5,670	1,190	Aceitável	5,695	1,3154	Aceitável

Com base na **tabela 34** pode-se verificar que, segundo o teste de Grubbs, não existe nenhum valor discrepante, para um nível de confiança de 95%.

Em conclusão, para a ISO 7238 o limite de repetibilidade calculado foi de 0,034g/100g. O limite de repetibilidade relativo foi de 0,649%.

Precisão intermédia

Foram analisadas 5 medições em duplicado de todas as matrizes, exceto da matriz de referência DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21), (população de 25 ensaios no total) para a determinação do pH do soro nas matrizes de manteigas. Os dados obtidos para cada uma das matrizes estudadas encontram-se no **Anexo D**. Os resultados obtidos para avaliar a precisão intermédia para cada uma das matrizes estão apresentados nas **tabelas 35 a 39**, onde se encontram os valores do desvio padrão da precisão intermédia (S_i) (equação 22), o limite da precisão intermédia (equação 23), o coeficiente de variação da precisão intermédia e no final de cada tabela um pequeno resumo dos resultados importantes obtidos em cada matriz.

Tabela 35. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga com sal.

pH						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
23.01.2017	Manteiga com sal	4,59	4,59	0,000	0,0000	4,59
24.01.2017		4,56	4,58	-0,020	0,0004	4,57
25.01.2017		4,52	4,53	-0,010	0,0001	4,53
26.01.2017		4,57	4,56	0,010	0,0001	4,57
27.01.2017		4,60	4,62	-0,015	0,0002	4,61
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,0091
Limite de precisão intermédia						0,0056
CV (%)						0,2%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga com sal foi de 0,0056 e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,2%.

Tabela 36. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga sem sal.

pH						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
23.01.2017	Manteiga sem sal	5,55	5,57	-0,020	0,0004	5,56
24.01.2017		5,46	5,48	-0,020	0,0004	5,47
25.01.2017		5,51	5,53	-0,020	0,0004	5,52
26.01.2017		5,52	5,53	-0,010	0,0001	5,53
26.01.2017		5,56	5,57	-0,005	0,00003	5,56
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,011
Limite de precisão intermédia						0,0058
CV (%)						0,2%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga sem sal foi de 0,0058 e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,2%.

Tabela 37. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga meio sal.

pH						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
23.01.2017	Manteiga meio sal	4,73	4,72	0,010	0,0001	4,72
24.01.2017		4,74	4,72	0,025	0,0006	4,73
25.01.2017		4,81	4,82	-0,010	0,0001	4,82
26.01.2017		4,81	4,81	0,000	0,0000	4,81
27.01.2017		4,88	4,89	-0,010	0,0001	4,89
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,0096
Limite de precisão intermédia						0,0056
CV (%)						0,2%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga meio sal foi de 0,0056 e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,2%.

Tabela 38. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga magra.

pH						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
23.01.2017	Manteiga magra	5,40	5,39	0,010	0,0001	5,40
24.01.2017		5,38	5,38	0,000	0,0000	5,38
25.01.2017		5,31	5,32	-0,010	0,0001	5,32
26.01.2017		5,37	5,38	-0,010	0,0001	5,38
27.01.2017		5,43	5,44	-0,005	0,00002	5,43
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,0057
Limite de precisão intermédia						0,0030
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga magra foi de 0,0030 e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

Tabela 39. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 7238, para a matriz manteiga com alho e salsa.

pH						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
23.01.2017	Manteiga com alho e salsa	6,22	6,22	0,000	0,0000	6,22
24.01.2017		6,22	6,23	-0,015	0,0002	6,22
25.01.2017		6,18	6,19	-0,005	0,00002	6,18
26.01.2017		6,25	6,25	0,005	0,00002	6,25
27.01.2017		6,15	6,16	-0,010	0,0001	6,16
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,0061
Limite de precisão intermédia						0,0028
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz manteiga com alho e salsa foi de 0,0028 e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

O método apresenta uma boa precisão intermédia para a análise do pH do soro em manteigas uma vez que o CV da precisão intermédia é suficientemente baixo (<10%). Na

tabela 40 estão apresentados os cálculos da população no geral, ou seja, tendo em conta todos os valores de todas as matrizes.

Tabela 40. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 7238.

População:	25
Desvio padrão da precisão intermédia (Si):	0,009
Limite de precisão intermédia (g/100g):	0,005
Coeficiente de variação de precisão intermédia:	0,2%

Em conclusão, para a ISO 7238 o limite de precisão intermédia do método foi 0,005g/100g e o coeficiente de variação de 0,2%.

7.3.3. Exatidão

Com a finalidade de avaliar a exatidão nesta norma ISO, foi utilizada a matriz de referência DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21), fazendo a comparação entre o valor obtido na medição, com o valor certificados e os limites superior e inferior. O resultado encontra-se na **tabela 41** e o certificado deste material de referência encontra-se no **anexo F**.

Tabela 41. Resultado obtido na matriz analisada.

Matriz	Valor medido	Valor certificado	Limite inferior	Limite superior	Avaliação da exatidão
DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21)	5,62	5,76	5,54	5,89	OK

Foi efetuado também, para avaliar a exatidão, um ensaio interlaboratorial com duas amostras da matriz Butter 160152, estando os resultados demonstrados na **tabela 42**:

Tabela 42. Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial.

Data	Circuito	Matriz	X_{lab}	X_{ref}	nº lab. participantes	Desvio (s_R)	"bias"	Avaliação
2016-09	DRRR	Butter 160152 (sample 1)	5,66	5,72	12	0,06	0,010	Aceitável
2016-09	DRRR	Butter 160152 (sample 2)	5,69	5,75	12	0,07	0,010	Aceitável

Segundo a **tabela 41**, o valor obtido para a matriz analisada foi de 5,62. Uma vez que este valor se encontra dentro dos limites estabelecidos, demonstra-se que este método, em relação à exatidão, cumpre com os critérios estabelecidos para a matriz analisada. Pelos ensaios de comparação interlaboratoriais na **tabela 42**, também se conclui que a exatidão é boa uma vez que os resultados foram aceites.

Com estes dados é possível avaliar o desempenho obtido pelo laboratório, através do cálculo do fator de desempenho (Z-score). Na matriz DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21), aplicando a equação 26 e sabendo que o desvio (S_R) é 0,07, calcula-se o Z em módulo que é de 1,0 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório).

7.3.4. Limite de Quantificação

Nesta norma ISO, não existe nenhuma expressão uma vez que o valor do pH é retirado diretamente do medidor de pH. Assim, o limite de quantificação é o valor de pH mais baixo usado na calibração do medidor de pH, ou seja, o limite de quantificação é de 2,00.

7.3.5. Gama de trabalho

Com o mesmo raciocínio, a gama de trabalho vai desde o valor do limite de quantificação até ao valor de pH mais alto usado na calibração do medidor de pH. Por isso, a gama de trabalho é de pH=2,00 a pH=9,22.

7.3.6. Incerteza

A determinação da incerteza foi realizada com base na norma ISO 11352:2012, recorrendo-se a materiais de referência certificados e segundo as equações apresentadas no **anexo D**.

Nesta norma ISO, foi utilizado apenas um material de referência certificado: DRRR Mild soured butter (RM CP L BU 21). Os resultados encontram-se na **tabela 43**.

Tabela 43. Avaliação da incerteza do método relativo ao MRC utilizado: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_{w,relativo})$, incerteza associada à componente sistemática $u_{bias,relativo}$, incerteza padrão combinada $u_{relativo}$ e incerteza expandida, $U_{relativo}$.

Materiais de Referência Certificados	
$U(R_{w,relativo})$	0,164
$u_{bias,relativo}$	2,582
$u_{relativo}$	2,587
$U_{relativo}$	5,174

Como é possível observar na **tabela 43**, a incerteza expandida associada à ISO 7238 para a determinação do pH do soro da manteiga é de 5,17%.

7.4. ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos (Método de referência)

7.4.1. Matrizes

De forma a validar a norma ISO 5534, utilizaram-se as seguintes matrizes:

- ✓ DRRR Processed cheese (M CP L SK 13).
- ✓ DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8).
- ✓ Queijo magro.
- ✓ Queijo da ilha.
- ✓ Queijo flamengo.

7.4.2. Precisão

Repetibilidade

Foram efetuados 8 ensaios sobre as matrizes referidas nas mesmas condições (mesmo laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e intervalos de tempo). Os dados obtidos dos 8 ensaios encontram-se no **Anexo C**, estando os resultados obtidos na **tabela 44**:

Tabela 44. Estudo da repetibilidade para a determinação do conteúdo de sal, referente à norma ISO 5534.

Amostra	Média	Variância	Desvio Padrão	CVr %	Limite de repetibilidade (Δr) (g/100g)
DRRR Processed cheese (M CP L SK 13)	46,80	0,011	0,102	0,218	0,286
DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8)	56,25	0,003	0,051	0,090	0,142
Queijo magro	45,78	0,015	0,123	0,269	0,344
Queijo da ilha	61,65	0,001	0,027	0,044	0,077
Queijo flamengo	55,18	0,015	0,122	0,222	0,342

Os limites de repetibilidade calculados para as matrizes variam entre os valores 0,077 e 0,344 g/100g e os coeficientes de variação de repetibilidade variam entre os 0,044 e os 0,269%. O método apresenta uma boa repetibilidade para a análise do conteúdo total de sólidos em queijos uma vez que o CVr é suficientemente baixo (<10%).

Os resultados obtidos pelo Teste C de Cochran e pelo Teste de Grubbs encontram-se nas **tabelas 45 e 46** respetivamente e as tabelas relativas a estes testes estatísticos estão apresentadas no **Anexo B**.

Tabela 45. Teste C de Cochran para as matrizes estudadas para a ISO 5534.

	Número de matrizes	Maior Variância	C de Cochran calculado	Valor crítico tabelado- Cc (5%)	Avaliação
Teste C de Cochran	5	0,0151	0,3451	0,4244	Aceitável

Com base na **tabela 45**, nenhuma matriz foi rejeitada uma vez que após o cálculo do teste de Cochran, o C calculado desta matriz mostrou-se inferior ao C tabelado a 5%.

Tabela 46. Teste de Grubbs para as matrizes de manteigas estudadas para a ISO 5534.

Amostra	População	Valor Crítico 1%	Valor mínimo	G Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	G Valor máximo	Teste ao valor máximo
DRRR Processed cheese (M CP L SK 13)	5	2,274	46,66	1,371	Aceitável	46,93	1,332	Aceitável
DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8)	5	2,274	56,18	1,553	Aceitável	56,34	1,630	Aceitável
Queijo magro	5	2,274	45,64	1,162	Aceitável	45,98	1,592	Aceitável
Queijo da ilha	5	2,274	61,61	1,573	Aceitável	61,69	1,233	Aceitável
Queijo flamengo	5	2,274	55,02	1,300	Aceitável	55,44	2,143	Aceitável

Com base na tabela pode-se verificar que, segundo o teste de Grubbs, não existe nenhum valor discrepante, para um nível de confiança de 95%.

Em conclusão, para a ISO 5534 o limite de repetibilidade calculado foi de 0,238g/100g e o coeficiente de variação foi de 0,471%.

Precisão Intermédia

Para o cálculo da precisão intermédia foram analisadas 5 medições em duplicado das 5 matrizes (população de 25 ensaios no total) para a determinação do conteúdo total de sólidos em matrizes de queijos. Os dados obtidos para cada uma das matrizes estudadas encontram-se no **Anexo D**. Os resultados obtidos para avaliar a precisão intermédia para cada uma das matrizes estão apresentados nas **tabelas 47 a 51**, onde se encontram os valores do desvio padrão da precisão intermédia (S_i) (equação 22), o limite da precisão

intermédia (equação 23), o coeficiente de variação da precisão intermédia e no final de cada tabela um pequeno resumo dos resultados importantes obtidos em cada matriz.

Tabela 47. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz DRRR Processed cheese (M CP L SK 13).

Conteúdo total de Sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
25.01.2017	DRRR Processed cheese (M CP L SK 13)	46,65	46,92	-0,276	0,076	46,78
30.01.2017		46,33	46,65	-0,325	0,106	46,49
03.02.2017		46,69	46,27	0,419	0,176	46,48
21.02.2017		46,47	46,45	0,023	0,001	46,46
24.02.2017		46,94	46,67	0,267	0,071	46,80
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,207
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,012
CV (%)						0,4%

O limite de precisão intermédia para a matriz DRRR Processed cheese (M CP L SK 13) foi de 0,012g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,4%.

Tabela 48. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8).

Conteúdo total de Sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
25.01.2017	DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8)	56,29	56,26	0,034	0,001	56,27
30.01.2017		56,22	56,21	0,009	0,0001	56,21
03.02.2017		56,21	56,11	0,100	0,010	56,16
21.02.2017		56,27	56,66	-0,392	0,154	56,46
24.02.2017		56,30	56,05	0,255	0,065	56,17
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,152
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,008
CV (%)						0,3%

O limite de precisão intermédia para a matriz DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8) foi de 0,008g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,3%.

Tabela 49. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo magro.

Conteúdo total de Sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
30.01.2017	Queijo magro	46,00	45,96	0,032	0,001	45,98
03.02.2017		45,95	45,84	0,107	0,012	45,90
21.02.2017		45,94	45,95	-0,015	0,0002	45,95
24.02.2017		45,93	45,92	0,008	0,0001	45,92
01.03.2017		45,88	45,74	0,138	0,019	45,81
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,056
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,003
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz queijo magro foi de 0,003g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

Tabela 50. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo da ilha.

Conteúdo total de Sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
30.01.2017	Queijo da ilha	61,88	61,87	0,012	0,0001	61,87
03.02.2017		61,93	61,86	0,076	0,006	61,89
21.02.2017		61,92	61,94	-0,021	0,0004	61,93
24.02.2017		61,54	61,69	-0,152	0,023	61,62
01.03.2017		61,27	61,42	-0,144	0,021	61,34
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,070
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,003
CV (%)						0,1%

O limite de precisão intermédia para a matriz queijo da ilha foi de 0,003g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,1%.

Tabela 51. Resultados obtidos nos ensaios realizados para avaliar a precisão intermédia pela norma ISO 5534, para a matriz queijo flamengo.

Conteúdo total de Sólidos (%)						
Data	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	A-B	(A-B) ²	Média Ensaios
30.01.2017	Queijo Flamengo	55,04	55,33	-0,290	0,084	55,18
03.02.2017		55,44	55,42	0,022	0,001	55,43
21.02.2017		55,00	55,29	-0,291	0,085	55,15
24.02.2017		55,25	55,25	0,003	0,0000	55,25
01.03.2017		55,06	55,07	-0,011	0,0001	55,06
População						5
Desvio padrão da precisão intermédia (Si)						0,130
Limite de precisão intermédia (g/100g)						0,007
CV (%)						0,2%

O limite de precisão intermédia para a matriz queijo flamengo foi de 0,001g/100g e o coeficiente de variação de precisão intermédia de 0,2%.

Na **tabela 52** estão apresentados os cálculos da população no geral, ou seja, tendo em conta todos os valores de todas as matrizes.

Tabela 52. Resultados gerais do estudo da precisão intermédia para a ISO 5534.

População:	25
Desvio padrão da precisão intermédia (Si):	0,135
Limite de precisão intermédia:	0,007
Coeficiente de variação de precisão intermédia:	0,3%

Em conclusão, para a ISO 5534 o limite de precisão intermédia do método foi 0,007g/100g e o coeficiente de variação foi 0,3%.

7.4.3. Exatidão

A exatidão foi demonstrada com base nos resultados obtidos das matrizes de referência analisadas (DRRR Processed cheese (M CP L SK 13) e DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8)) presentes na **tabela 53** e através de ensaios de comparação

interlaboratorial aplicados em 4 matrizes presentes na **tabela 54**. Os certificados destes dois materiais de referência encontram-se no **anexo F**.

Tabela 53. Resultado obtido na matriz analisada pela norma ISO 5534.

Matriz	Valor medido (g/100 g)	Valor certificado (g/100 g)	Limite inferior (g/100 g)	Limite superior (g/100 g)	Avaliação da exatidão
DRRR Processed cheese	46,80	47,00	46,74	47,26	OK
DRRR Semi hard cheese	56,25	56,42	55,80	57,04	OK

Tabela 54. Resultados obtidos nos ensaios de comparação interlaboratorial.

Data	Circuito	Matriz	X _{lab}	X _{ref}	nº lab. Participantes	Desvio (S _R)	"bias"	Avaliação
2012-04	Inter 2000	Cheese	60,00	59,70	38	0,38	0,005	Aceitável
2013-03	Inter 2000	Cheese	71,40	71,33	31	0,400	0,001	Aceitável
2016-10	LGC	Soft cheese	74,11	74,24	30	0,450	0,002	Aceitável
2017-01	LGC	Soft cheese	54,98	55,44	13	0,450	0,008	Aceitável

Os valores obtidos para as matrizes DRRR Processed cheese e DRRR Semi hard cheese foram de 46,80 e 56,25 g/100g, respetivamente. Uma vez que estes valores se encontram dentro dos limites estabelecidos, demonstra-se que este método, em relação à exatidão, cumpre com os critérios estabelecidos para a matriz analisada. Os valores dos ensaios de comparação interlaboratorial foram todos aceites, tendo-se comprovado novamente que o método apresenta uma boa exatidão.

Com estes dados é possível avaliar o desempenho obtido pelo laboratório, através do cálculo do fator de desempenho (Z-score). Na matriz DRRR Processed cheese, aplicando a equação 26 e sabendo que o desvio (S_R) é 0,13, calcula-se o Z em módulo que é de 1,54 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório). Na matriz DRRR Semi hard cheese, aplicando a equação 26 e sabendo que o desvio (S_R) é 0,31, calcula-se o Z em módulo que é de 0,55 (< 2 logo é o desempenho é satisfatório).

7.4.4. Limite de Quantificação

Nesta norma ISO, o conteúdo total de sólidos (%) foi calculado a partir da seguinte **equação 36**:

$$\text{Conteúdo total de sólidos (\%)} = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_4)}{m_1} * 100 \quad (36)$$

Onde:

- m_0 é a massa da caixa metálica, em gramas;
- m_1 é a massa da amostra, em gramas;
- m_2 é a massa da caixa metálica e da amostra seca, em gramas;
- m_3 é a massa da caixa metálica do ensaio em branco após secagem, em gramas;
- m_4 é a massa da caixa metálica do ensaio do branco.

Foi utilizada a expressão de resultados para determinar o limite de quantificação, tal como se efetuou para a ISO 6731. Obteve-se um valor de 0,066, sendo difícil comprovar-se experimentalmente, por isso majorou-se o valor para 1,00g/100g. Assim, o limite de quantificação é de 1,00 g/100 g.

7.4.5. Gama de trabalho

Tal como em casos anteriores, a gama de trabalho deste método para a determinação do conteúdo total de sólidos em matrizes de queijos e queijos processados foi de 1,00g/100 g a 70,00g/100g.

7.4.6. Incerteza

A determinação da incerteza foi realizada com base na norma ISO 11352:2012, recorrendo-se a materiais de referência certificados e segundo as equações apresentadas no anexo D.

Nesta norma ISO, foram utilizados os materiais de referência certificados: DRRR Processed cheese (M CP L SK 13) e DRRR Semi hard cheese, grated (Gouda) (M CP L SHK 8). Os resultados encontram-se na **tabela 55**.

Tabela 55. Avaliação da incerteza do método relativo aos dois MRC utilizados: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial $U(R_{w,relativo})$, incerteza associada à componente sistemática $u_{bias,relativo}$, incerteza padrão combinada $u_{relativo}$ e incerteza expandida, $U_{relativo}$.

Materiais de Referência Certificados	
$U(R_{w,relativo})$	0,254
$u_{bias,relativo}$	0,446
$u_{relativo}$	0,514
$U_{relativo}$	1,027

Como é possível observar na **tabela 55**, a incerteza expandida associada à ISO 5534 para a determinação do conteúdo total de sólidos em queijo e queijo processado é de 1,03%.

8. Conclusão

Com o intuito de demonstrar que os procedimentos analíticos referentes às normas acima descritas são adequados à finalidade pretendida, o presente relatório teve como base a implementação e execução em condições reais de 4 normas ISO referentes à determinação de diversos parâmetros em diferentes matrizes lácteas. Por este motivo e tal como no ponto anterior, as conclusões foram divididas por norma ISO.

8.1. ISO 17189: Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar- Determinação da matéria gorda

A norma ISO 17189 permite a determinação do conteúdo de matéria gorda em matrizes de manteigas, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar.

Para o cálculo da repetibilidade, foram utilizadas 6 matrizes. Os limites de repetibilidade variaram entre os 0,744 e 1,755g/100g e os coeficientes de variação obtidos variaram entre os 0,480 e 1,085%. No geral, esta norma ISO apresentou um limite de repetibilidade de 1,178g/100g e um coeficiente de variação de 2,213%. Em termos de precisão intermédia, apenas foram utilizadas 4 matrizes e os limites de precisão intermédia variaram entre os 0,010 e 0,037g/100g e os coeficientes de variação entre os 0,4 e 1,0%. O limite de precisão intermédia da norma ISO foi de 0,026g/100g e o coeficiente de variação de 1%. Assim o método considera-se válido em relação a estes dois parâmetros.

A exatidão foi avaliada com base em dois materiais de referência certificados, tendo-se determinado o fator de desempenho z-score para estas duas matrizes que se apresentou inferior a 2 (logo os resultados são satisfatórios), e através de um ensaio interlaboratorial. Concluiu-se que o método é exato.

O limite de quantificação foi estimado para 5,00g/100g e a gama de trabalho para 5,00 a 70,00g/100g.

Por último a incerteza expandida foi estimada de 1,96%.

8.2. ISO 6731: Leite, natas e leite evaporado- Determinação do conteúdo total de sólidos

A norma ISO 6731 permite a determinação do conteúdo total de sólidos em matrizes de leite, natas e leite evaporado, tendo sido utilizadas 6 matrizes.

Em termos da repetibilidade, os limites de repetibilidade variaram entre os 0,039 e 0,241g/100g e os coeficientes de variação obtidos variaram entre os 0,150 e 0,703%. No geral, esta norma ISO apresentou um limite de repetibilidade de 0,161g/100g e um coeficiente de variação de 0,857%. Em termos de precisão intermédia, os limites de precisão intermédia variaram entre os 0,0020 e 0,0220g/100g e os coeficientes de variação entre os 0,1 e 0,8%. O limite de precisão intermédia da norma ISO foi de 0,010g/100g e o coeficiente de variação de 0,3%. Assim o método considera-se válido em relação a estes dois parâmetros.

A exatidão foi avaliada com base em três materiais de referência certificados, tendo-se determinado o fator de desempenho z-score para estas três matrizes que se apresentou inferior a 2 (logo os resultados são satisfatórios), e através de um ensaio interlaboratorial. Concluiu-se que o método é exato.

Obteve-se o valor de 0,02g/100g para o limite de quantificação e 0,02 a 50,00g/100g para a gama de trabalho.

Por último a incerteza expandida foi de 1,17%.

8.3. ISO 7238: Manteiga- Determinação do pH do soro (método potenciométrico)

A norma ISO 7238 permite a determinação do pH do soro em matrizes de manteiga.

Para o cálculo da repetibilidade, foram utilizadas 6 matrizes. Os limites de repetibilidade variaram entre os 0,028 e 0,039g/100g e os coeficientes de variação obtidos variaram entre os 0,176 e 0,303%. No geral, esta norma ISO apresentou um limite de repetibilidade de 0,034g/100g e um coeficiente de variação de 0,649%. Em termos de precisão intermédia, apenas foram utilizadas 5 matrizes e os limites de precisão intermédia variaram entre os 0,003 e 0,006g/100g e os coeficientes de variação entre os 0,1 e 0,2%. O limite de precisão intermédia da norma ISO foi de 0,005g/100g e o coeficiente de variação de 0,2%. Assim o método considera-se válido em relação a estes dois parâmetros.

A exatidão foi avaliada com base num material de referência certificado, tendo-se determinado o fator de desempenho z-score para esta matriz que se apresentou inferior a 2 (logo os resultados são satisfatórios), e através de dois ensaios interlaboratoriais. Concluiu-se que o método é exato.

O limite de quantificação está relacionado com o valor de pH mais baixo usado para a calibração do medidor de pH, sendo então de 2,00.

Seguindo o mesmo raciocínio, a gama de trabalho inicia-se no valor de pH mais baixo e vai até ao valor de pH mais elevado usado na calibração do medidor do pH, ou seja, vai de 2,00 a 9,22.

Por último a incerteza expandida foi de 5,17%.

8.4. ISO 5534: Queijo e queijo processado- Determinação do conteúdo total de sólidos (Método de referência)

A norma ISO 5534 permite a determinação do conteúdo total de sólidos em matrizes de queijo e queijo processado, tendo sido utilizadas 5 matrizes.

Em termos da repetibilidade, os limites de repetibilidade variaram entre os 0,0767 e 0,3443g/100g e os coeficientes de variação obtidos variaram entre os 0,045 e 0,269%. No geral, esta norma ISO apresentou um limite de repetibilidade de 0,238g/100g e um coeficiente de variação de 0,471%. Em termos de precisão intermédia, os limites de precisão intermédia variaram entre os 0,003 e 0,012g/100g e os coeficientes de variação entre os 0,1 e 0,4%. O limite de precisão intermédia da norma ISO foi de 0,007g/100g e o coeficiente de variação de 0,3%. Assim o método considera-se válido em relação a estes dois parâmetros.

A exatidão foi avaliada com base em dois materiais de referência certificados, tendo-se determinado o fator de desempenho z-score para estas duas matrizes que se apresentou inferior a 2 (logo os resultados são satisfatórios), e através de quatro ensaios interlaboratoriais. Concluiu-se que o método é exato.

Obteve-se o valor de 1,00g/100g para o limite de quantificação e 1,00 a 70,00g/100g para a gama de trabalho.

Por último a incerteza expandida foi de 1,03%.

8.5. Considerações finais

A importância deste trabalho residiu na utilidade de se ter 4 métodos de análise validados e otimizados na empresa *Silliker* Portugal, capazes de responder adequadamente ao seu propósito. Assim, o objetivo principal centrou-se no estudo e validação de 4 normas ISO referentes à determinação do conteúdo total de sólidos em leites, natas e leite evaporado e em queijos e queijos processados (ISO 6731 e ISO 5534, respetivamente), à determinação do conteúdo de matéria gorda em manteigas, emulsões de óleos edíveis e gorduras para barrar (ISO 17189) e à determinação do pH do soro da manteiga (ISO 7238).

Pela realização da validação e avaliação dos parâmetros desta, pode-se afirmar que todas estas normas anteriores são simples, exatas e precisas, traduzindo-se em resultados fiáveis. Os limites de quantificação, gama de trabalho e incerteza são aceitáveis e estão de acordo com os parâmetros definidos pelo laboratório de Química da *Silliker*, tendo sido este objetivo principal cumprido com sucesso resultado da motivação, empenho e dedicação a este projeto. Realizada a validação destes diferentes métodos analíticos, o laboratório deverá efetuar um controlo constante da sua execução, garantindo que as condições de validade destes métodos não são alteradas.

Considerando os restantes objetivos em que se baseia este trabalho todos foram cumpridos, tendo sido o desenvolvimento desta tese em ambiente empresarial bastante enriquecedor e revelando a oportunidade de aplicar as minhas competências laboratoriais adquiridas ao longo da minha formação académica e de aprender novas competências.

9. Bibliografia

1. Scollan, N., et al., *Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality*. Meat Science, 2006. **74**(1): p. 17-33.
2. FAO, *The State of the Food Insecurity, 2001*. 2002.
3. Leite, F., *Validação em Análise Química*, ed. E. Átomo. 1996.
4. Taylor, J.K., *Quality Assurance of Chemical Measurements*, ed. CRC Press. 1997.
5. Relacre, A.d.L.A.d.P., *Guia Relacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaaios em Análise Química*. 2000: Lisboa. p. 60.
6. Silliker, *Manual da Qualidade*. 12^a ed, ed. S. SA. 2016.
7. Mérieux, I. <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/silliker-Portugal>. 2016.
8. Mérieux, I. <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/silliker/sobre-a-silliker/sobre-a-silliker/garantia-da-qualidade-dos-servicos-analiticos>. 2016.
9. Mérieux, I. <http://www.merieuxnutrisciences.pt/pt/por/grupo/dados-da-empresa>. 2016.
10. Da Silva, M.S. and I. Rudkowska, *Dairy products on metabolic health: Current research and clinical implications*. Maturitas, 2014. **77**(3): p. 221-228.
11. Bojnec, Š. and I. Fertő, *Export competitiveness of dairy products on global markets: The case of the European Union countries*. Journal of Dairy Science, 2014. **97**(10): p. 6151-6163.
12. Roupas, P., P. Williams, and C. Margetts, *Regulatory Issues and Functional Health Claims for Bioactive Compounds*, in *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. 2009, Wiley-Blackwell. p. 311-327.
13. Grillenberger, M., et al., *Intake of micronutrients high in animal-source foods is associated with better growth in rural Kenyan school children*. British Journal of Nutrition, 2006. **95**(2): p. 379-390.
14. Rahnama, H. and S. Rajabpour, *Factors for consumer choice of dairy products in Iran*. Appetite, 2017. **111**: p. 46-55.
15. Rozenberg, S., et al., *Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis*,

- Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases*. *Calcified Tissue International*, 2016. **98**(1): p. 1-17.
16. Lu, W., et al., *Dairy products intake and cancer mortality risk: a meta-analysis of 11 population-based cohort studies*. *Nutrition Journal*, 2016. **15**: p. 91.
 17. Ellen Muehlhoff, A.B.a.D.M., *Milk and dairy products in human nutrition*. 2013: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
 18. Theobald, H.E., *Dietary calcium and health*. *Nutrition Bulletin*, 2005. **30**(3): p. 237-277.
 19. Weaver, C.M., W.R. Proulx, and R. Heaney, *Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999. **70**(3): p. 543s-548s.
 20. Jebb, S.A., *Dietary determinants of obesity*. *Obesity Reviews*, 2007. **8**: p. 93-97.
 21. Zemel, M.B., et al., *Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2005. **29**(4): p. 391-397.
 22. Zemel, M.B., et al., *Effects of Calcium and Dairy on Body Composition and Weight Loss in African-American Adults*. *Obesity Research*, 2005. **13**(7): p. 1218-1225.
 23. Zemel, M.B., et al., *Calcium and Dairy Acceleration of Weight and Fat Loss during Energy Restriction in Obese Adults*. *Obesity Research*, 2004. **12**(4): p. 582-590.
 24. Abou-Samra, R., et al., *Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter*. *Nutrition Journal*, 2011. **10**(1): p. 139.
 25. Westerterp-Plantenga, M.S., *The significance of protein in food intake and body weight regulation*. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2003. **6**(6): p. 635-638.
 26. Feinleib, M., *Seven countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease*. *JAMA*, 1981. **245**(5): p. 511-512.
 27. Menotti, A., et al., *Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: Cross-cultural correlations in the Seven Countries Study*. *European Journal of Epidemiology*, 1999. **15**(6): p. 507-515.

28. Bernstein, A.M., et al., *Major Dietary Protein Sources and Risk of Coronary Heart Disease in Women*. Circulation, 2010. **122**(9): p. 876-883.
29. Moss, M. and D. Freed, *The cow and the coronary: epidemiology, biochemistry and immunology*. International Journal of Cardiology, 2003. **87**(2-3): p. 203-216.
30. Segall, J.J., *Dietary lactose as a possible risk factor for ischaemic heart disease: review of epidemiology*. International Journal of Cardiology, 1994. **46**(3): p. 197-207.
31. Soedamah-Muthu, S.S., et al., *Milk and dairy consumption and incidence of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011. **93**(1): p. 158-171.
32. Gibson, R.A., et al., *The effect of dairy foods on CHD: a systematic review of prospective cohort studies*. British Journal of Nutrition, 2009. **102**(9): p. 1267-1275.
33. PEREIRA, C.M.D.S., *DINÂMICA DE GRUPO PARA CONSTRUÇÃO DE CONHECIMENTOS: ELABORAÇÃO DE UMA UNIDADE DE PROCESSAMENTO DE LEITE ORGÂNICO*. 2005, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO.
34. Meisel, H., *Multifunctional peptides encrypted in milk proteins*. BioFactors, 2004. **21**(1-4): p. 55-61.
35. Delgado, A.M., S. Parisi, and M.D. Vaz Almeida, *Milk and Dairy Products*, in *Chemistry of the Mediterranean Diet*. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 139-176.
36. Berg JM, T.J., Stryer L. , *Important Derivatives of Cholesterol Include Bile Salts and Steroid Hormones.*, in *Biochemistry.*, W.H. Freeman, Editor. 2002: New York.
37. Campbell, J.R. and R.T. Marshall, *The science of providing milk for man*. 1975, New York: McGraw Hill Book Company. 801 pp.
38. Mattar, R., D.F. de Campos Mazo, and F.J. Carrilho, *Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors*. Clinical and Experimental Gastroenterology, 2012. **5**: p. 113-121.

39. Massey, L.K. and S.J. Whiting, *Caffeine, Urinary Calcium, Calcium Metabolism and Bone*. The Journal of Nutrition, 1993. **123**(9): p. 1611-1614.
40. Keum, N., et al., *Calcium intake and colorectal cancer risk: Dose–response meta-analysis of prospective observational studies*. International Journal of Cancer, 2014. **135**(8): p. 1940-1948.
41. Sopelana, P., et al., *Characterisation of the lipidic components of margarines by 1H Nuclear Magnetic Resonance*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 3357-3364.
42. Vučić, V., et al., *Trans fatty acid content in Serbian margarines: Urgent need for legislative changes and consumer information*. Food Chemistry, 2015. **185**: p. 437-440.
43. Codex Alimentarius, *Milk and Milk Products*. 2011, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).
44. Portaria nº 742/92 de 24 de Julho.
45. Chandan, R.C. and K. O'Rell, *Principles of yogurt processing*, in *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. 2013, John Wiley & Sons. p. 239-261.
46. Everett, D.W., *Cream Products*, in *Handbook of Food Products Manufacturing*. 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 725-749.
47. Deosarkar, S.S., et al., *Cream: Types of Cream*, in *Encyclopedia of Food and Health*. 2016, Academic Press: Oxford. p. 331-337.
48. https://en.wikipedia.org/wiki/Evaporated_milk. [cited 2017 31 de Março].
49. NATILENE MESQUITA BRITO, O.P.D.A.J., LUCIANA POLESE , MARIA LÚCIA RIBEIRO, *VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO*. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, 2003. **13**: p. 129-146.
50. IPQ, *NP EN ISO/IEC 17025: 2005- Requisitos gerais de competência para laboratórios*. . 2005.
51. EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd ed. ed. 2014.
52. Huber, L., *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2nd ed. ed. 2007: Informa Healthcare USA, Inc.

53. Piet van Zoonen, R.H., Steven M. Gort, Henk J. van de Wiel, Henk A. van 't Klooster, *Some practical examples of method validation in the analytical laboratory*. trends in analytical chemistry, 1999. **18**.
54. SillikerSA, *PCQ.34 – Procedimento de Controlo da Qualidade.34, Validação de métodos em análise química*. 2014.
55. SillikerSA, *PCQ.04 –Procedimento de Controlo da Qualidade.04, Controlo da Qualidade*. . 2013.
56. Miller, J.M.a.J., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2005: Pearson Education Limited.
57. Ribani, M., et al., *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, 2004. **27**: p. 771-780.
58. Ribeiro, F.A.d.L., et al., *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*. Química Nova, 2008. **31**: p. 164-171.
59. DOQ-CGCRE-008, *Orientação sobre validação de métodos de ensaio*. 2007: INMETRO.
60. Figueiredo, T.M.P., *VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar*, in *Área de especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente*. 2012, Universidade de Coimbra: Departamento de Química.
61. Eurachem, *Terminology in Analytical Measurement - Introduction to VIM 3*,. 1a ed. ed. 2011: Eurachem.
62. Gustavo González, A. and M. Ángeles Herrador, *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(3): p. 227-238.
63. Organization, I.S., *Water Quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data (ISO 11352)*. 2012.
64. SARGAÇO, B., *Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa.*, in *ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA*. 2013, INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA.

65. Relacre, A.d.L.A.d.P., *Guia Relacre 7- Ensaios Interlaboratoriais em Química*. 1996: Lisboa.
66. USP, *Validation of Compendial Methods*. United States Pharmacopoeia, 2006.
67. Chui, Q.S.H., J.M.d.A. Bispo, and C.O. Iamashita, *O papel dos programas interlaboratoriais para a qualidade dos resultados analíticos*. Química Nova, 2004. **27**: p. 993-1003.
68. Oliveira, E.C.d., *COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS PARA A EXCLUSÃO DE "OUTLIERS"*. Rede Metrológica do Estado de São Paulo - REMESP, 2008.
69. *Norma ISO 17189- Manteiga, emulsões de óleos edíveis e gorduras espalháveis: Determinação da matéria gorda*. 2003.
70. SillikerSA, *PAFQ.044-Métodos de preparação das amostras para análise.044*. 2014.
71. *Norma ISO 6731- Leite, natas e leite evaporado: Determinação do conteúdo total de sólidos*. 2010.
72. Organization, I.S., *ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. . 2002.
73. *Valores Crítico para o teste de Cochran para um nível de significância de 5%*. [cited 2016 12 de Dezembro]; Available from: http://www.de.ufpb.br/~ulisses/disciplinas/tabela_cochran_5.pdf.

9. Anexos

Anexo A: Rótulo das matrizes compradas



MAGRA
-41% DE GORDURA*

Becel

ProActiv

REDUZ ATIVAMENTE O COLESTEROL

915316

26-11-16 L617932088 14:44 4

VALORES NUTRICIONAIS MÉDIOS:

	por 100g	por porção**	%*por porção**
Energia	1320 kJ/319 kcal	132 kJ/32 kcal	2%
Lípidos	35 g	3,5 g	5%
dos quais saturados	8 g	0,8 g	4%
monossaturados	9 g	0,9 g	
polissaturados	18 g	1,8 g	
Hidratos de Carbono	1,6 g	<0,5 g	<1%
dos quais açúcares	<0,5 g	<0,5 g	<1%
Proteínas	<0,5 g	<0,5 g	<1%
Sal	0,046 g	<0,01 g	<1%
Vitamina A	800 µg (100% VRN ¹)	80 µg (10% VRN ¹)	
Vitamina D	7,5 µg (150% VRN ¹)	0,75 µg (15% VRN ¹)	
Vitamina E	10 mg (80% VRN ¹)	1,0 mg (8,0% VRN ¹)	
Esteróis vegetais ***	7,5g	0,75g	

VRN¹ - Valores de referência do nutriente
 *** Os esteróis não contribuem para o valor energético
 *% Dose de referência para um adulto médio (8400kJ/2000kcal)
 Esta embalagem contém aproximadamente 25 porções de 10g.
 **1 porção = 10 g

3 porções de 10g por dia contém a quantidade ótima a ser consumida de esteróis vegetais (2g) para reduzir ativamente o colesterol

CONSERVAR NO FRIGORÍFICO
 Consumir de preferência antes de: ver tampa
 Unilever Jerónimo Martins, Lda
 Largo Monterroio Mascarenhas,
 n.º 1 1099-081 Lisboa

Creme vegetal para barrar a 35% com esteróis vegetais adicionados
 Ingredientes: Água, óleos vegetais (girassol, linhaça e colza, em proporções variáveis), gordura de palma*, ésteres de esteróis vegetais*** (12,5%), amido modificado, soro de LEITE em pó, emulsionantes (mono e diglicéridos de ácidos gordos e lecitina de girassol), conservante (sorbato de potássio), regulador de acidez (ácido cítrico), aromas naturais, corante (carotenos), vitamina A e D. ***Equivalente a 7,5% de esteróis vegetais. *A Unilever tem o compromisso para a gordura de palma sustentável. Saiba mais em www.unilever-jm.pt
 Foi demonstrado que os esteróis vegetais reduzem o colesterol no sangue. Colesterol elevado é um fator de risco no desenvolvimento de doenças coronárias. Este produto não se destina a pessoas que não necessitem de controlar os níveis de colesterol no sangue. O consumo de uma dose diária de 1,5-2,4 g de esteróis vegetais pode baixar o colesterol entre 7 a 10% em 2 a 3 semanas. Consuma à refeição como parte de um regime alimentar equilibrado e variado, que inclua o consumo frequente de frutas e produtos hortícolas para ajudar a manter os níveis de carotenóides. Certas pessoas têm necessidades alimentares especiais. Grávidas, lactantes, crianças até aos 5 anos e indivíduos sob medicação para baixar o colesterol deverão, por isso, aconselhar-se com o seu médico antes de consumir qualquer produto para redução de colesterol. Não é recomendável a ingestão de mais de 3g por dia de esteróis vegetais adicionados

ECOPONTO
AMARELO

Figura 7. Rótulo da margarina Proactiv magra, da marca Becel.



Figura 8. Rótulo da manteiga com alho e salsa, da marca Mimosa.

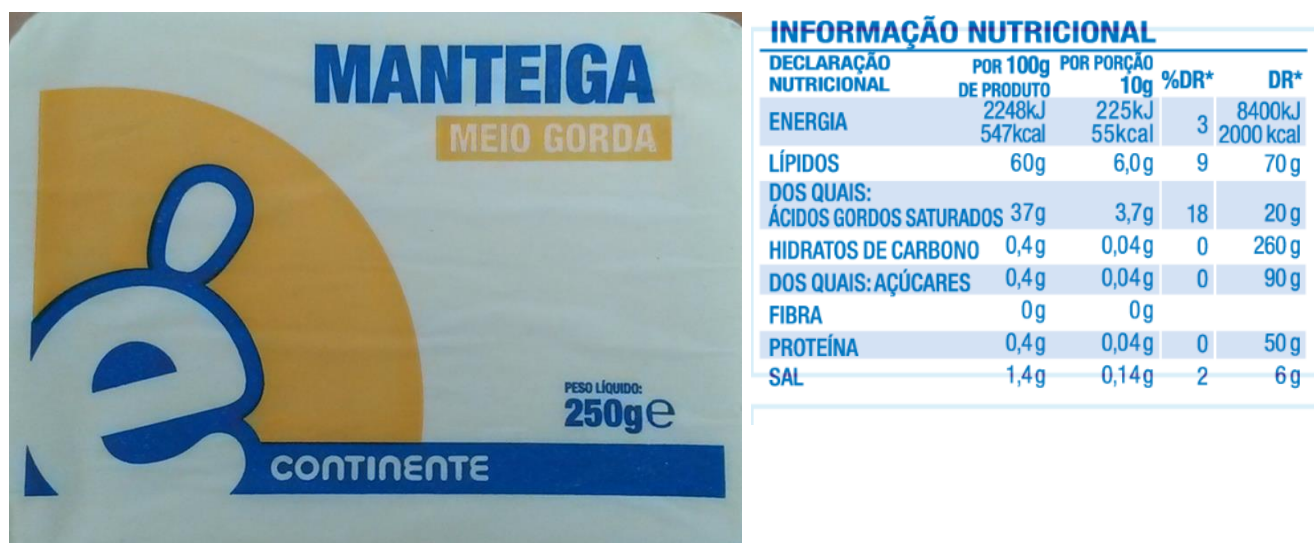


Figura 9. Rótulo da manteiga com sal, da marca é Conteinte.



MANTEIGA MAGRA COM SAL (40% M.G) INGREDIENTES: Água, manteiga, amido modificado, sal (1,4%), acidificante (E270), emulsionante (E471), espessante (E466), conservante (E202), corante (E160a) e aromatizantes.				
ATENÇÃO ALERGÉNIOS: Contém leite				
CONSUMIR DE PREFERÊNCIA ANTES DE: (ver embalagem) LOTE: (ver embalagem) MODO DE CONSERVAÇÃO: Conservar entre 2°C e 8°C.				
...do com o sexo, idade, nível de actividade física e ...estão típico de energia e nutrientes, que a maioria ...no âmbito de uma alimentação saudável.				
...entos, mas para uma alimentação mais saudável, ...es verdes e laranjas do que vermelhos.				
INFORMAÇÃO NUTRICIONAL MÉDIA	POR 100 g DE PRODUTO	POR DOSE (20 g) %VDR*	VDR*	
VALOR ENERGÉTICO	1550kJ 376kcal	310kJ 75kcal	3,8	2000kcal
PROTEÍNAS	0,3g	0,1g	0,1	50g
HIDRATOS DE CARBONO	3,8g	0,8g	0,3	270g
DOS QUAIS: AÇÚCARES	1,5g	0,3g	0,3	90g
LÍPIDOS DOS QUAIS: SATURADOS	40g 26g	8g 5,2g	11,4 26	70g 20g
FIBRAS	0g	0g	0	25g
SÓDIO (SAL)	0,6g (1,4g)	0,1g (0,3g)	4,6	2,4g (6g)

Figura 10. Rótulo da manteiga magra, da marca Continente.

DECLARAÇÃO NUTRICIONAL / NUTRITION DECLARATION / DÉCLARATION NUTRITIONNELLE				
Valores médios / Average values / Valeurs moyennes	Por / Per / Pour 100 ml	Porção / Per portion / Par portion (250 ml)	% DR / RI / AR*	
Energia / Energy / Énergie	197 kJ/47 kcal	493 kJ/117 kcal	6 %	
Lípidos / Fat / Matières Grasses	1,6 g	4,0 g	6 %	
dos quais / of which / dont Acidos gordos saturados / Saturates / Acides gras saturés	1,1 g	2,8 g	14 %	
Hidratos de Carbono / Carbohydrate / Glucides	4,9 g	12,3 g	5 %	
dos quais / of which / dont Açúcares / Sugars / Sucres	4,9 g	12,3 g	14 %	
Fibra / Fibre / Fibres alimentaires	<0,1 g	<0,1 g		
Proteínas / Protein / Protéines	3,2 g	8,0 g	16 %	
Sal / Salt / Sel	0,1 g	0,3 g	4 %	
Vitaminas e Sais Minerais / Vitamins and Minerals / Vitamines et Sels minéraux				
Cálcio / Calcium / Calcium	120 mg (15% VRN /NRV/VNR**)	300 mg (38% VRN /NRV/VNR**)		

Uma porção (250 ml) contém / One portion (250 ml) contains / Une portion (250 ml) contient				
493 kJ 117 kcal	LÍPIDOS/FAT / MATIÈRES GRASSES 4,0 g	SATURADOS / SATURATES / SATURÉS 2,8 g	AÇÚCARES / SUGARS / SUCRES 12,3 g	SAL / SALT / SEL 0,3 g
6%	6%	14%	14%	4%

*Doses de Referência para um adulto médio / Reference Intake of an average adult / Apport de référence pour un adulte-type (8400 kJ/2000 kcal)
 Por / Per / Pour 100 ml: 197 kJ / 47 kcal

Figura 11. Rótulo do Leite Meio-Gordo, da marca Masterchef.

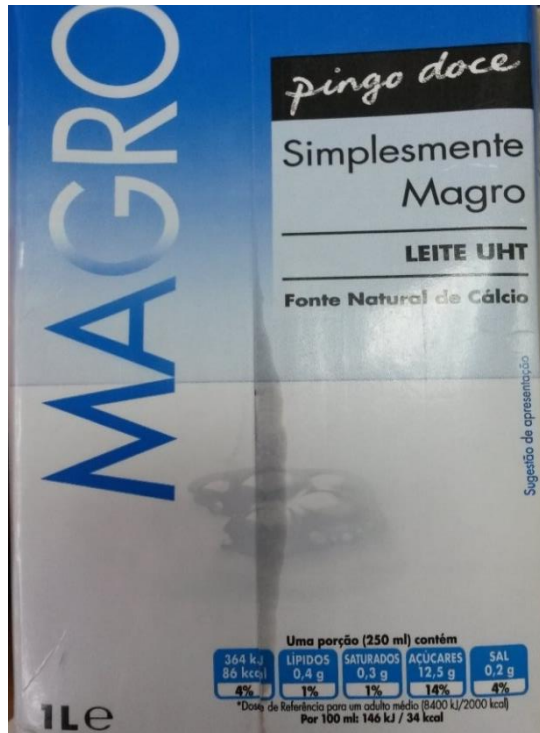


Figura 12. Rótulo do Leite Magro, da marca Pingo Doce.



Figura 13. Rótulo das Natas Magras, da marca Páturages.

Anexo B: Tabelas com testes estatísticos

Tabela 56. Valores críticos para o teste de Grubbs para um nível de significância de 1% e 5%. [72]

p	Valor crítico a 1%	Valor crítico a 5%
3	1,155	1,155
4	1,496	1,481
5	1,764	1,715
6	1,973	1,887
7	2,139	2,02
8	2,274	2,126
9	2,387	2,215
10	2,482	2,29
11	2,564	2,355
12	2,636	2,412
13	2,699	2,462
14	2,755	2,507
15	2,806	2,549
16	2,852	2,585
17	2,894	2,62
18	2,932	2,651
19	2,968	2,681
20	3,001	2,709
21	3,031	2,733
22	3,06	2,758
23	3,087	2,781
24	3,112	2,802
25	3,135	2,822
26	3,157	2,841
27	3,178	2,859
28	3,199	2,876
29	3,218	2,893
30	3,236	2,908
31	3,253	2,924
32	3,27	2,938
33	3,286	2,952
34	3,301	2,965
35	3,316	2,979
36	3,33	2,991
37	3,343	3,003
38	3,356	3,014
39	3,369	3,025
40	3,381	3,036

p = número de ensaios efetuados

Tabela 57. Valores críticos para o teste de Cochran referentes ao nível de significância de 5%. (Adaptado de [73])

[illegible]

Anexo C: Tabelas com dados obtidos para cada matriz em cada norma ISO para avaliar a repetibilidade

ISO 17189

Tabela 58. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 17189.

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Gorduras, óleos, sementes oleaginosas e derivados	FAPAS								
	T14151 Mixed fat spread	59,16	59,56	59,08	59,55	58,82	59,54	58,62	59,23
	FAPAS								
	T14167 Mixed fat spread	58,64	58,27	58,26	57,83	58,22	57,87	58,19	57,84
	Margarina (redução colesterol)	43,22	42,57	42,54	42,35	42,58	42,80	43,28	42,16
	Margarina	57,15	57,18	57,39	57,05	58,21	58,42	58,64	57,83
Leite, produtos lácteos e derivados	Manteiga com sal	62,83	63,11	62,52	62,10	61,49	63,03	62,58	61,66
	Manteiga magra	38,57	38,11	38,72	38,29	38,77	38,77	38,61	38,89

ISO 6731

Tabela 59. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 6731.

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Leite, produtos lácteos e derivados	DRRR								
	Evaporated milk	25,41	25,33	25,42	25,52	25,34	25,48	25,56	25,49
	DRRR Raw cream	42,19	42,12	42,34	42,32	42,17	42,25	42,18	42,12
	DRRR UHT Milk	12,13	12,30	12,14	12,20	12,29	12,20	12,33	12,35
	Leite magro	9,331	9,350	9,344	9,332	9,342	9,345	9,332	9,371
	Leite meio gordo	11,66	11,61	11,69	11,61	11,70	11,62	11,67	11,66
	Natas magras	26,01	25,97	25,95	26,03	26,08	25,97	26,00	26,01

ISO 7238

Tabela 60. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 7238.

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Leite, produtos lácteos e derivados	Manteiga com alho e salsa	6,30	6,29	6,30	6,31	6,32	6,28	6,29	6,29
	Manteiga com sal	4,57	4,58	4,57	4,60	4,59	4,57	4,59	4,60
	Manteiga sem sal	5,66	5,65	5,65	5,68	5,67	5,68	5,67	5,66
	Manteiga magra	5,35	5,35	5,35	5,38	5,38	5,37	5,35	5,35
	Manteiga meio sal	4,78	4,76	4,77	4,78	4,76	4,79	4,76	4,77
	DRRR Mild Soured Butter	5,68	5,70	5,67	5,69	5,68	5,69	5,67	5,70

ISO 5534

Tabela 61. Dados do estudo da repetibilidade para norma ISO 5534.

Grupo	Matriz	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8
Leite, produtos lácteos e derivados	Queijo da ilha	61,65	61,61	61,66	61,66	61,66	61,69	61,67	61,61
	Queijo flamengo	55,20	55,13	55,10	55,20	55,15	55,02	55,18	55,44
	Queijo magro	45,90	45,87	45,69	45,71	45,67	45,64	45,98	45,79
	Processed cheese	46,91	46,71	46,73	46,89	46,74	46,66	46,81	46,93
	Semi-hard cheese	56,21	56,23	56,30	56,25	56,28	56,34	56,25	56,18

Anexo D: Tabelas com dados obtidos para cada matriz em cada norma ISO para avaliar a precisão intermédia

Nas tabelas seguintes estão apresentados os seguintes parâmetros: resultado obtido dos duplicados, a diferença entre os duplicados (W_i), W_i^2 e a média dos duplicados de cada matriz e para cada ISO.

ISO 17189

Tabela 62. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 17189.

Data	Amostra	Ensaio A	Ensaio B	W_i	W_i^2	Média
14-11-2016	Manteiga com sal	61,66	62,10	0,44	0,19	61,88
17-11-2016		61,75	62,85	1,11	1,22	62,30
22-11-2016		61,91	61,87	0,04	0,00	61,89
02-12-2016		62,64	61,54	1,10	1,22	62,09
09-12-2016		61,87	62,57	0,70	0,49	62,22
14-11-2016	Manteiga magra	38,75	38,86	0,11	0,01	38,80
17-11-2016		38,46	38,65	0,18	0,03	38,55
22-11-2016		39,02	38,45	0,57	0,32	38,73
02-12-2016		38,71	37,59	1,12	1,26	38,15
09-12-2016		38,85	37,88	0,96	0,93	38,36
09-12-2016	Margarina	57,77	58,34	0,56	0,32	58,06
04-01-2017		57,26	57,95	0,69	0,48	57,60
09-01-2017		58,52	57,67	0,85	0,72	58,10
13-01-2017		57,59	58,59	1,00	1,00	58,09
19-01-2017		57,74	57,68	0,06	0,00	57,71
22-11-2016	Margarina (Redução de colesterol)	42,84	42,79	0,04	0,00	42,81
02-12-2016		43,03	43,28	0,25	0,06	43,16
09-01-2017		43,65	43,32	0,33	0,11	43,48
13-01-2017		42,78	42,56	0,23	0,05	42,67
19-01-2017		42,77	42,73	0,04	0,00	42,75

ISO 6731

Tabela 63. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 6731.

Data	Amostra	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi ²	Média
25-11-2016	DRRR UHT Milk	12,36	12,42	0,065	0,004	12,39
06-12-2016		12,29	12,43	0,136	0,019	12,36
15-12-2016		12,41	12,24	0,168	0,028	12,33
11-01-2017		12,23	12,36	0,137	0,019	12,30
20-01-2017		12,50	12,35	0,149	0,022	12,43
06-12-2016	DRRR Evaporated Milk	25,21	25,21	0,001	0,000	25,21
15-12-2016		25,59	25,63	0,043	0,002	25,61
11-01-2017		25,74	25,71	0,024	0,001	25,72
20-01-2017		25,23	25,25	0,021	0,000	25,24
23-01-2017		25,38	25,35	0,022	0,000	25,37
01-02-2017	Leite magro	9,37	9,32	0,052	0,003	9,34
02-02-2017		9,91	9,96	0,043	0,002	9,93
07-02-2017		9,18	9,19	0,006	0,000	9,18
09-02-2017		9,23	9,25	0,024	0,001	9,24
10-02-2017		9,26	9,23	0,027	0,001	9,24
01-02-2017	Leite meio gordo	10,14	10,08	0,057	0,003	10,11
02-02-2017		11,69	11,66	0,037	0,001	11,67
09-02-2017		10,04	10,03	0,007	0,000	10,04
10-02-2017		10,04	10,01	0,033	0,001	10,03
14-02-2017		10,03	10,14	0,115	0,013	10,08
02-02-2017	Natas magras	26,00	25,95	0,046	0,002	25,97
07-02-2017		25,99	25,96	0,031	0,001	25,97
09-02-2017		26,09	26,10	0,005	0,000	26,09
10-02-2017		26,04	26,07	0,026	0,001	26,05
14-02-2017		26,07	26,01	0,059	0,003	26,04
20-01-2017	DRRR Raw cream	42,37	42,30	0,076	0,006	42,34
23-01-2017		42,04	42,38	0,343	0,118	42,21

24-01-2017	42,26	42,229	0,029	0,001	42,24
------------	-------	--------	-------	-------	-------

ISO 7238

Tabela 64. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 7238.

Data	Amostra	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi ²	Média
23.01.2017	Manteiga com sal	4,59	4,59	0,00	0,00	4,59
24.01.2017		4,56	4,58	0,02	0,00	4,57
25.01.2017		4,52	4,53	0,01	0,00	4,53
26.01.2017		4,57	4,56	0,01	0,00	4,57
27.01.2017		4,60	4,62	0,02	0,00	4,61
23.01.2017	Manteiga sem sal	5,55	5,57	0,02	0,00	5,56
24.01.2017		5,46	5,48	0,02	0,00	5,47
25.01.2017		5,51	5,53	0,02	0,00	5,52
26.01.2017		5,52	5,53	0,01	0,00	5,53
26.01.2017		5,56	5,57	0,01	0,00	5,56
23.01.2017	Manteiga meio sal	4,73	4,72	0,01	0,00	4,72
24.01.2017		4,74	4,72	0,03	0,00	4,73
25.01.2017		4,81	4,82	0,01	0,00	4,82
26.01.2017		4,81	4,81	0,00	0,00	4,81
27.01.2017		4,88	4,89	0,01	0,00	4,89
23.01.2017	Manteiga magra	5,40	5,39	0,01	0,00	5,40
24.01.2017		5,38	5,38	0,00	0,00	5,38
25.01.2017		5,31	5,32	0,01	0,00	5,32
26.01.2017		5,37	5,38	0,01	0,00	5,38
27.01.2017		5,43	5,44	0,01	0,00	5,43
23.01.2017	Manteiga com alho e salsa	6,22	6,22	0,00	0,00	6,22
24.01.2017		6,22	6,23	0,02	0,00	6,22
25.01.2017		6,18	6,19	0,01	0,00	6,18
26.01.2017		6,25	6,25	0,01	0,00	6,25
27.01.2017		6,15	6,16	0,01	0,00	6,16

ISO 5534

Tabela 65. Dados da precisão intermédia das matrizes da norma ISO 5534.

Data	Amostra	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi ²	Média
25-01-2017	Processed cheese	46,65	46,92	0,28	0,08	46,78
30-01-2017		46,33	46,65	0,32	0,11	46,49
03-02-2017		46,69	46,27	0,42	0,18	46,48
21-02-2017		46,47	46,45	0,02	0,00	46,46
24-01-2017		46,94	46,67	0,27	0,07	46,80
30-01-2017	Queijo da ilha	61,88	61,87	0,01	0,00	61,87
03-02-2017		61,93	61,86	0,08	0,01	61,89
21-02-2017		61,92	61,94	0,02	0,00	61,93
24-01-2017		61,54	61,69	0,15	0,02	61,62
01-03-2017		61,27	61,42	0,14	0,02	61,34
25-01-2017	Semi-hard cheese	56,29	56,26	0,03	0,00	56,27
30-01-2017		56,22	56,21	0,01	0,00	56,21
03-02-2017		56,21	56,11	0,10	0,01	56,16
21-02-2017		56,27	56,66	0,39	0,15	56,46
24-02-2017		56,30	56,05	0,26	0,07	56,17
30-01-2017	Queijo magro	46,00	45,96	0,03	0,00	45,98
03-02-2017		45,95	45,84	0,11	0,01	45,90
21-02-2017		45,94	45,95	0,01	0,00	45,95
24-02-2017		45,93	45,92	0,01	0,00	45,92
01-03-2017		45,88	45,74	0,14	0,02	45,81
30-01-2017	Queijo flamengo	55,04	55,33	0,29	0,08	55,18
03-02-2017		55,44	55,42	0,02	0,00	55,43
21-02-2017		55,00	55,29	0,29	0,08	55,15
24-02-2017		55,25	55,25	0,00	0,00	55,25
01-03-2017		55,06	55,07	0,01	0,00	55,06

Anexo E: Cálculos utilizados na estimativa da incerteza

Tal como já foi referido anteriormente, os cálculos da incerteza dada pela componente sistemática (exatidão) variam consoante se utilize um material de referência certificado ou mais do que um.

Os parâmetros iniciais necessários para o cálculo da incerteza expandida (reportada como incerteza final) são idênticos nos dois casos acima descritos. Os parâmetros são os seguintes:

- n : número de resultados;
- \overline{LV} : média do valor obtido pelo laboratório que é dado pela seguinte equação:

$$\overline{LV} = \frac{\sum_{i=1}^n LV_i}{n} \quad (37)$$

- CV: valor do MRC dado no certificado;
- $u(C_{ref})$: é a componente da incerteza fornecida no certificado. Normalmente vem descrito no certificado, mas também pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$u(C_{ref}) = \frac{\frac{UCL - LCL}{2}}{k} \quad (38)$$

Sendo UCL o limite de controlo superior, LCL o limite de controlo inferior e o k o fator de cobertura (definido como sendo 2).

- $u(R_{w,relativo})$: é o valor da componente aleatória (precisão);
- $bias_{relativo}$ que é dado pela equação:

$$bias_{relativo} = \frac{\overline{LV} - CV}{CV} * 100 \quad (39)$$

- S_{bias} : é o desvio padrão associado a todos os resultados obtidos dos MRC e é dado pela equação:

$$S_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (LV_i - \overline{LV})^2}{n - 1}} \quad (40)$$

- $S_{bias\ relativo}$ é dado pela equação:

$$S_{bias\ relativo} = \frac{S_{bias}}{\overline{LV}} * 100 \quad (41)$$

- $u(C_{ref\ relativo})$ é dado pela equação:

$$u(C_{ref\ relativo}) = \frac{u(C_{ref})}{CV} * 100 \quad (42)$$

No caso de se utilizar apenas um único MRC, os cálculos a serem efetuados são:

$$1. \ u(bias)_{relativo} = \sqrt{(bias_{relativo})^2 + (\frac{S_{bias\ relativo}}{\sqrt{n}})^2 + u(C_{ref})_{relativo}^2} \quad (43)$$

A partir daqui já entra a incerteza combinada e por último a incerteza expandida, descritas nas equações 25 e 26 respetivamente.

Quando se utiliza mais do que um MRC, são necessárias as seguintes equações:

1. $RMS_{bias,relativo}$ é a raiz quadrada da média aritmética dos quadrados de um conjunto de números e é dada pela expressão:

$$RMS_{bias,relativo} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias_{relativo,i})^2}{n_{MRC}}} \quad (44)$$

Onde o $bias_{relativo}$ é o mesmo da equação 39 e o n_{MRC} é o número de MRC analisados.

2. $\overline{u(C_{ref})_{relativo}}$ é a componente média de incerteza dos valores certificados (em %) e é calculado a partir da equação:

$$\overline{u(C_{ref})_{relativo}} = \frac{\sum_{i=1}^n u(C_{ref})_{relativo,i}}{n} \quad (45)$$

$$3. \ u(bias)_{relativo} = \sqrt{(RMS_{bias,relativo})^2 + \overline{u(C_{ref})_{relativo}}^2} \quad (46)$$

Por fim calcula-se a incerteza combinada e por último a incerteza expandida, descritas nas equações 25 e 26 respetivamente.

Anexo F: Certificados dos Materiais de Referência Certificados (MRC)

Nesta seção estão apresentados os dados retirados dos certificados dos Materiais de Referência. É certo que os certificados são mais extensos, contudo aqui só vão aparecer a parte onde se retiraram os valores usados neste relatório.

FAPAS® Report 14151

Table 2: Participants' Comments

participant number	comments
054	Reference method: LI.00-531-1 GC-FID
065	Butyric Acid with GC-FID

comments are as submitted by participants

Table 3: Assigned Values and Standard Deviations for Proficiency

analyte	data points, n	assigned value, x_a	units	uncertainty, u	standard deviation for proficiency, σ_p	
total fat	48	59.51	g/100g sample	0.160	Horwitz [6]	0.771
butyric acid	28	1.10	g/100g fat	0.040	Coll. Trial [7]	0.099
cholesterol	58	55.49	mg/100g sample	1.05	ffp	4.55

Col. Trial = collaborative trial data ffp = fitness-for-purpose criteria

Figura 14. Certificado do MRC FAPAS T14151 Mixed fat spread.

Food Chem. Report 14167

Table 2: Assigned Values and Standard Deviations for Proficiency

analyte	data points, n	assigned value, x_a	units	uncertainty, u	standard deviation for proficiency, σ_p	
Total Fat	38	57.97	g/100g of sample	0.190	Horwitz [7]	0.761
Butyric Acid	25	1.80	g/100g of fat	0.048	Coll. Trial [8]	0.162
Cholesterol	54	86.4	mg/100g of sample	0.979	ffp	7.08

ffp = fitness for purpose criteria

Table 3: Number and Percentage of z-Scores where $|z| \leq 2$

analyte	number of scores where $ z \leq 2$	total number of scores	% $ z \leq 2$
Total Fat	29	38	76
Butyric Acid	19	25	76
Cholesterol	46	54	85

Figura 15. Certificado do MRC FAPAS T14167 Mixed fat spread.


Certificate of Reference Materials			
			
evaporated milk 8% fat RM CP L KM 13 ref. 28.11.2016			
<u>reference values</u>			
parameter	reference value	uncertainty	unit
fat	8,04	$\pm 0,02$	g/100g
dry matter	25,47	$\pm 0,12$	g/100g
protein (Nx 6,38)	6,55	$\pm 0,04$	g/100g
ash	1,54	$\pm 0,05$	g/100g
phosphorus (P)	----	----	----

Figura 16. Certificado do MRC DRRR Evaporated Milk (RM CP L KM 13).


Certificate of Reference Materials			
			
raw cream(K7) RM CP L R 38 ref. 28.11.2016			
<u>reference values</u>			
parameter	reference value	uncertainty	unit
fat	36,09	$\pm 0,11$	g/100g
dry matter	42,13	$\pm 0,06$	g/100g
protein (Nx 6,38)	2,25	$\pm 0,02$	g/100g

Figura 17. Certificado do MRC DRRR Raw Cream (RM CP L R 38).

Certificate of Reference Materials			
UHT milk 3.5% fat RM CP L M 52 ref. 28.11.2016			
reference values			
parameter	reference value	uncertainty	unit
fat	3,513	$\pm 0,027$	g/100g
dry matter	12,286	$\pm 0,069$	g/100g
protein (Nx 6,38)	3,255	$\pm 0,038$	g/100g
lactose (monohydrate)	4,766	$\pm 0,049$	g/100g
freezing point	-0,5202	$\pm 0,0022$	°C
density	1,0294	$\pm 0,0007$	g/ml

Figura 18. Certificado do MRC DRRR UHT Milk (RM CP L M 52).

Certificate of Reference Materials			
mild soured butter RM CP L BU 21 ref. 13.02.2017			
reference values			
parameter	reference value	uncertainty	unit
non-fatty dry matter	1,78	$\pm 0,12$	g/100g
water content	15,60	$\pm 0,14$	g/100g
hardness	----	----	----
cholesterol	227,20	$\pm 14,05$	mg/100g
ph-value	5,76	$\pm 0,05$	

Figura 19. Certificado do MRC DRRR Mild Soured Butter (RM CP L BU 21).

Certificate of Reference Materials			
processed cheese M CP L SK 13 ref. 28.11.2016			
<u>reference values</u>			
parameter	reference value	uncertainty	unit
fat	24,30	± 0,17	g/100g
dry matter	47,00	± 0,12	g/100g
protein (N x 6,38)	10,27	± 0,11	g/100g
total lactic acid	428,00	± 39,38	mg/100g
pH value	5,80	± 0,02	
sodium chloride	1,10	± 0,02	g/100g
nitrate	33,91	± 2,40	mg/kg
citric acid	434,58	± 47,49	mg/100g
phosphorus	750,04	± 18,81	mg/100g
ash	7,05	± 0,18	g/100g

Figura 20. Certificado do MRC DRRR Processed Cheese (VI CP L SK 13).

Certificate of Reference Materials			
semi hard cheese, grated (Gouda) M CP L SHK 8 ref. 28.11.2016			
<u>reference values</u>			
parameter	reference value	uncertainty	unit
fat	27,35	± 0,47	g/100g
dry matter	56,42	± 0,14	g/100g
protein (N x 6,38)	23,34	± 0,20	g/100g
sodium chloride	1,64	± 0,03	g/100g
nitrate (NO3-)	----	----	----

Figura 21. Certificado do MRC DRRR Semi-Hard Cheese (VI CP L SHK 8).